

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas Y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LAS MACAMIDAS SINTÉTICAS
N-BENCILINOLENAMIDA Y METOXI-BENCILINOLENAMIDA EN LÍNEAS
CELULARES DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y**

Tesis presentada por las Bachilleres:

Gómez Murillo, Andrea Corina

Quintanilla Pino, Rocio Elizabeth

para optar el título profesional de:

Ingeniera Biotecnóloga

Asesora:

Mgter. Paredes Fuentes, Julitza

AREQUIPA- PERÚ

2018

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N° 20180000023250

N° Trámite en Fac. 386-2018
Fecha Recep. Fac. 22-05-2018

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **GOMEZ MURILLO, Andrea Corina**
QUINTANILLA PINO, Rocío Elizabeth

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"EVALUACION Y CITOTOXICIDAD DE LAS MACAMIDAS N-BENCIL-LINOLENAMIDA (77) Y METIL-BENCIL-LINOLENAMIDA (78) EN LINEAS CELULARES NEURONALES SHYSY"

DICTAMINADORES: **Dr. José Villanueva Salas** 2) **Ing. Jose Carpio Carpio**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **"EVALUACION DE LA CITOTOXICIDAD DE LAS MACAMIDAS N-BENCIL-LINOLENAMIDA (77) Y METIL-BENCIL-LINOLENAMIDA (78) EN LINEAS CELULARES NEURONALES SHYSY"**, después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente
FIRMAS: (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA **08/06/18**

ASESOR: **Mgter. Julitza Paredes Fuentes**

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: **"EVALUACION DE LA CITOTOXICIDAD DE LAS MACAMIDAS SINTETICAS N-BENCILINOLENAMIDA (77) Y METIL-BENCILONOLENAMIDA (78) EN LINEAS CELULARES DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y"**, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad

Atentamente
FIRMA FECHA **24/10/18**

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dr. José Villanueva Salas**
- 2) **Dr. Fredy Molina Rodríguez**
- 3) **Mgter. José Carpio Carpio**

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis sugiriendo se cambie el título a: **"EVALUACION DE LA CITOTOXICIDAD DE LAS MACAMIDAS SINTETICAS N-BENCILINOLENAMIDA Y METOXI-BENCILINOLENAMIDA EN LINEAS CELULARES DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y"** y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, por lo que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente
FIRMAS: (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA **06.11.18.**

JURADOS: PRESIDENTE **Dr. José Villanueva Salas**
VOCAL **Dr. Fredy Molina Rodríguez**
SECRETARIO **Mgter. José Carpio Carpio**

FECHA **23 Nov. 18** HORA **19.00** LOCAL **C-402**

FIRMA DEL DECANO

FECHA



DEDICATORIA

A nuestros padres los cuales nos apoyaron incondicionalmente.

A nuestros familiares y amigos que impulsaron a la ejecución del proyecto y alcance de nuestro éxito

Es un honor compartir con ustedes la pasión que causa la investigación y el deseo de ser mejores personas.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Massachusetts College of Pharmacy and Health Science, en especial al Dr. Alejandro Pino Figueroa por la oportunidad que nos ofreció al acceder de pasantía en Boston. A Mgter. Alejandro Rondón Ortiz por su tiempo y conocimientos brindados. A Nicholas Jakowenko por dejarnos formar parte de su proyecto.

Al Dr. José Villanueva Salas por su apoyo incondicional y guía a lo largo de este proceso.

A nuestra asesora Mgter. Julitza Paredes por su orientación y tiempo dedicado.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
INTRODUCCIÓN.....	XV
CAPÍTULO I.....	XX
MARCO TEÓRICO.....	xx
ABREVIATURAS.....	1
HIPÓTESIS.....	1
OBJETIVO.....	1
1 1. MACA (<i>Lepidium meyenii</i>).....	1
1.1.1. CARACTERÍSTICAS.....	1
1.1.2. CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	1
1.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	2
1.1.4. PROPIEDADES TERAPÉUTICAS.....	2
1.2. MACAMIDAS.....	2
1.2.1. SÍNTESIS DE MACAMIDAS.....	3
1.2.1. NEUROPROTECCIÓN DE LAS MACAMIDAS.....	4
1.3 CULTIVOS CELULARES.....	5
1.3.1. LÍNEA CELULAR <i>SH-SY5Y</i>	5
1.4 CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR.....	24
1.4.1 MÉTODO DE AZUL DE TRIPÁN.....	25
1.4.2 ENSAYOS DE REDUCCIÓN DE TETRAZOLIO.....	25
1.4.2.1. MÉTODO MTS.....	26

1.4.2.2. METODO MTT.....	26
1.4. CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR.....	25
1.4.1 MÉTODO DE AZUL DE TRIPÁN.....	25
1.4.2 ENSAYOS DE REDUCCIÓN DE TETRAZOLIO.....	25
1.4.2.1. MÉTODO MTS.....	25
1.4.2.2. METODO MTT.....	26
1.5. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR	8
1.5.1. NECROSIS	8
1.5.2 APOPTOSIS	9
1.5.3. PARTHANATOS.....	29
1.5.4. AUTOFAGIA.....	30
1.6 ACTIVIDAD DE CASPASA 3	12
1.7 FAMILIA Bcl-2.....	12
1.7.1 PROTEÍNA BAX	13
1.8 PROTEÍNA p53	13
1.9 PROTEINA LRP1	13
1.10 PROTEÍNA PARP-1	14
1.11 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROS)	15
CAPÍTULO II.....	16
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2.1. MATERIALES.....	17
2.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO	17
2.1.2. MEDIOS DE CULTIVO	17
2.1.3. MATERIAL DE LABORATORIO	17
2.1.4. EQUIPOS DE LABORATORIO.....	18
2.1.5. REACTIVOS	18

2.1.6. OTROS	19
2.2. MÉTODOS	20
2.2.1. OBTENCIÓN DE LAS MACAMIDAS	20
2.2.2. CULTIVO CELULAR.....	20
2.2.4. DETERMINACIÓN DE LA IC ₅₀	23
2.2.5. LISIS CELULAR.....	23
2.2.6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN LISADOS CELULARES ..	25
2.2.7. PROTEÍNAS ESPECÍFICAS EN LISADOS CELULARES (WESTERN BLOT)	26
2.2.8. DETERMINACIÓN DE LOS BIOMARCADORES (p53, PARP-1, LRP1 Y Bcl-2).....	28
2.2.9. DETECCIÓN Y REVELADO.....	29
2.2.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CASPASAS 3	29
2.2.11. DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS).....	30
2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
CAPÍTULO III.....	33
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
3.1. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR Y DETERMINACIÓN DE IC ₅₀	34
3.1.1. MACAMIDA SINTÉTICA <i>N-BENCILINOLENAMIDA</i> EN LÍNEAS CELULARES <i>SH-SY5Y</i>	34
3.1.2. MACAMIDA SINTÉTICA <i>METOXI-BENCILINOLENAMIDA</i> EN LÍNEAS CELULARES <i>SH-SY5Y</i>	37
3.4.1 CURVA DE CALIBRACIÓN DE CASPASAS	41
3.5. HIDRÓLISIS DE PARP-1 EN CÉLULAS <i>SH-SY5Y</i> (WESTERN BLOT) 45	
3.5.1. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA PARP- 1 EN LÍNEAS CELULARES <i>SHSY5Y</i> TRATADAS CON LAS MACAMIDAS SINTÉTICAS <i>N-</i> <i>BENCILINOLENAMIDA</i> Y <i>METOXI-BENCILINOLENAMIDA</i>	45

3.6. DETERMINACIÓN DE LRP1	48
3.6.1. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA LRP-1 EN LÍNEAS CELULARES SH-SY5Y TRATADAS CON MACAMIDAS SINTÉTICAS N- BENCILINOLENAMIDA Y METOXI-BENCILINOLENAMIDA	48
3.7. DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA p53.....	50
3.7.1. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA p53 EN LÍNEAS CELULARES SH- SY5Y TRATADAS CON MACAMIDAS SINTÉTICAS N- BENCILINOLENAMIDA Y METOXI-BENCILINOLENAMIDA	50
3.8. DETERMINACIÓN DE Bcl-2	52
3.8.1. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA BCL-2 EN LÍNEAS CELULARES SHSY5Y TRATADAS CON MACAMIDAS SINTÉTICAS N- BENCILINOLENAMIDA Y METOXI-BENCILINOLENAMIDA	52
3.10. ACTIVIDAD DE CASPASA 3	53
3.10.1. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CASPASA 3 EN LÍNEAS CELULARES SH-SY5Y TRATADAS CON MACAMIDAS SINTÉTICAS N- BENCILINOLENAMIDA Y METOXI-BENCILINOLENAMIDA	54
3.11. DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).....	55
3.12 DETECCIÓN DE ROS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA..	57
3.12.2 DETECCIÓN A ALTA INTENSIDAD	58
3.12.3. DETECCIÓN PRODUCIDA POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO..	59
CAPÍTULO IV.....	60
CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.....	60
4.1. CONCLUSIONES	61
4.2. SUGERENCIAS.....	63
BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características de <i>Lepidium Meyenni</i> : A) Morfología B) Roseta De Hojas Y C) Raíz Cónica. ⁽²⁾	1
Figura 2. Estructuras químicas de algunos ácidos grasos presentes en las macamidas. A) Ácido Linolenico B) Ácido Linoleico. ⁽¹³⁾	3
Figura 3. Fórmula química de las macamidas <i>N-Bencilinolenamida</i> y <i>Metoxi-Bencilinolenamida</i> . ⁽⁹⁾	4
Figura 4. Diferencias entre la apoptosis y necrosis. ⁽²²⁾	9
Figura 5. Vías de la apoptosis. ⁽²³⁾	10
Figura 6. Proceso de autofagia. ⁽³¹⁾	11
Figura 7. Distribución de los platos de 6 pocillos.....	24
Figura 8. Distribución del gel en el ensayo western blot.	27
Figura 9. Ensamblado del "sándwich" obtenido del protocolo de la empresa Abcam. ⁽⁵²⁾	28
Figura 10. Porcentaje de viabilidad celular vs concentración μM de la macamida sintética <i>N- Bencilinolenamida</i> (0 μM A 100 μM).....	35
Figura 11. Microplato post mts para la macamida sintética <i>N- Bencilinolenamida</i> . 1) Control, 2) 0.1 μM , 3) 0.3 μM , 4) 1 μM , 5) 3 μM , 6) 10 μM , 7) 30 μM Y 8) 100 μM	36
Figura 12. Porcentaje de viabilidad celular y obtención de Ic_{50} de la macamida sintética <i>N- Bencilinolenamida</i>	37
Figura 13. Porcentaje de viabilidad celular vs concentración μM de la macamida sintética <i>Metoxi-Bencilinolenamida</i> (0 μM A 100 μM).....	38
Figura 14. Microplato post mts para con la macamida sintética <i>Metoxi-Bencilinolenamida</i> . 1) Control, 2) 0.1 μM , 3) 0.3 μM , 4) 1 μM , 5) 3 μM , 6) 10 μM , 7) 30 μM Y 8) 100 μM	39
Figura 15. Porcentaje de viabilidad celular y obtención de la Ic_{50} macamida sintética <i>Metoxi-Bencilinolenamida</i>	40
Figura 16. Curva de calibración obtenida de las absorbancias vs la concentración de proteínas ($\mu\text{g}/\text{mL}$).	43

Figura 17. Curva de calibración obtenida de las absorbancias vs la concentración de proteínas ($\mu\text{g/mL}$).	45
Figura 18. Bandas obtenidas a partir del western blot para PARP - 1. Donde M es el marcador molecular, C es control, A es macamida sintética <i>N-Bencilinolenamida</i> ($10\mu\text{M}$), B es macamida sintética <i>N-Bencilinolenamida</i> ($30\mu\text{M}$), C ₁ es macamida sintética <i>Metoxi-Bencilinolenamida</i> ($10\mu\text{M}$) y D es macamida sintética <i>Metoxi-Bencilinolenamida</i> ($30\mu\text{M}$)	46
Figura 19. Efecto de las macamidas sintéticas <i>N-Bencilinolenamida</i> y <i>Metoxi-Bencilinolenamida</i> a concentración ($10\mu\text{M}$ Y $30\mu\text{M}$) sobre la hidrólisis de Parp-1 en células <i>SH-SY5Y</i> a través del método western blot.	47
Figura 20. Bandas obtenidas a partir del western blot para LRP-1. donde C es control, A es macamida sintética <i>N-Bencilinolenamida</i> ($10\mu\text{M}$), B es macamida sintética <i>N-Bencilinolenamida</i> ($30\mu\text{M}$), C ₁ es macamida sintética <i>Metoxi-Bencilinolenamida</i> ($10\mu\text{M}$) y D es macamida sintética <i>Metoxi-Bencilinolenamida</i> ($30\mu\text{M}$)	48
Figura 21. Efecto de las macamidas sintéticas <i>N-Bencilinolenamida</i> y <i>Metoxi-Bencilinolenamida</i> a concentración $10\mu\text{M}$ y $30\mu\text{M}$ sobre LRP1 en líneas celulares <i>SH-SY5Y</i>	49
Figura 22. Bandas obtenidas a partir del western blot para p53. Donde M es el marcador molecular, C es control, A es macamida sintética <i>N-Bencilinolenamida</i> ($10\mu\text{M}$), B es macamida sintética <i>N-Bencilinolenamida</i> ($30\mu\text{M}$), C ₁ es macamida sintética <i>Metoxi-Bencilinolenamida</i> ($10\mu\text{M}$) y D es macamida sintética <i>Metoxi-Bencilinolenamida</i> ($30\mu\text{M}$).	50
Figura 23. Efecto de las macamidas sintéticas <i>N-Bencilinolenamida</i> y <i>Metoxi-Bencilinolenamida</i> a concentración $10\mu\text{M}$ y $30\mu\text{M}$ sobre p53 en las líneas celulares <i>SH-SY5Y</i>	51
Figura 24. Bandas obtenidas a partir del western blot para Bcl-2. Donde M es el marcador molecular, C es control, A es macamida sintética <i>N-Bencilinolenamida</i> ($10\mu\text{M}$), B es macamida sintética <i>N-Bencilinolenamida</i> ($30\mu\text{M}$), C ₁ es macamida sintética <i>Metoxi-Bencilinolenamida</i> ($10\mu\text{M}$) y D es macamida sintética <i>Metoxi-Bencilinolenamida</i> ($30\mu\text{M}$).	52
Figura 25. Efecto de las macamidas sintéticas <i>N-Bencilinolenamida</i> y <i>Metoxi-Bencilinolenamida</i> A concentración $10\mu\text{M}$ y $30\mu\text{M}$ de Bcl-2 en líneas celulares <i>SH-SY5Y</i>	53

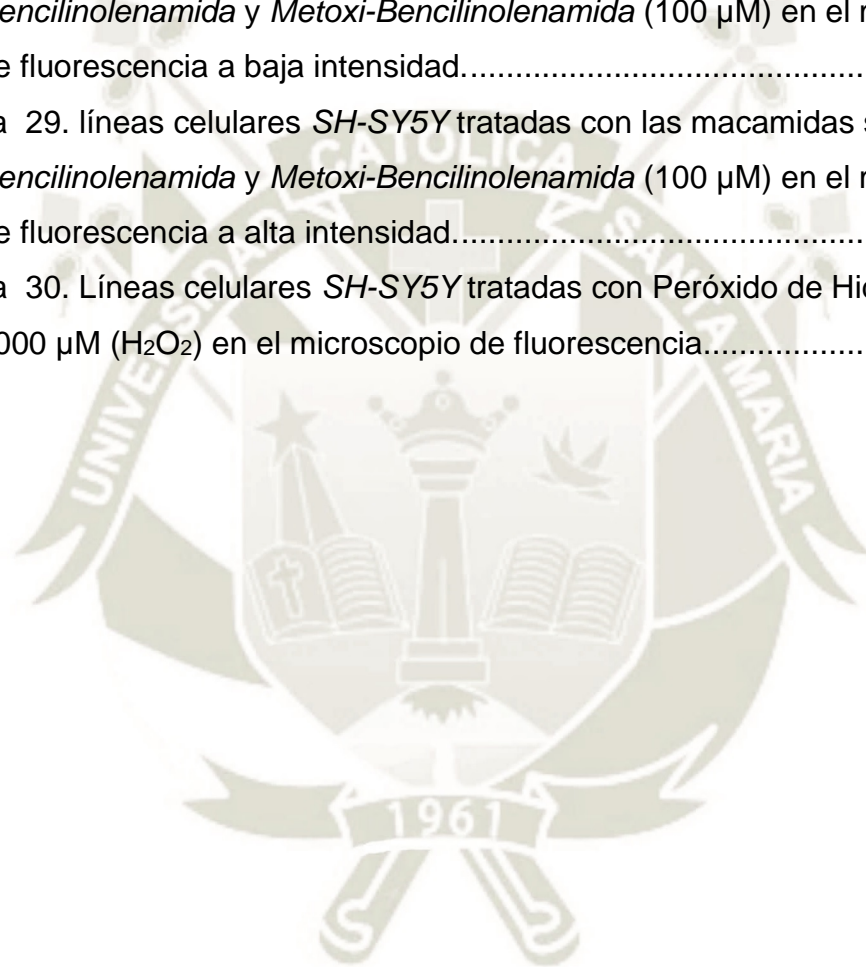
Figura 26. Cantidad de caspasa 3 presente en las diferentes concentraciones de las macamidas..... 54

Figura 27. Generación de especies reactivas de Oxígeno (EROS) a las 2 horas (a), 4 horas (b) y 5 horas (c) producidas por las macamidas sintéticas *N-Bencilinolenamida* y *Metoxi-Bencilinolenamida* (10 μ M, 30 μ M Y 100 μ M). 56

Figura 28. Líneas celulares *SH-SY5Y* tratadas con las macamidas sintéticas *N-Bencilinolenamida* y *Metoxi-Bencilinolenamida* (100 μ M) en el microscopio de fluorescencia a baja intensidad..... 57

Figura 29. líneas celulares *SH-SY5Y* tratadas con las macamidas sintéticas *N-Bencilinolenamida* y *Metoxi-Bencilinolenamida* (100 μ M) en el microscopio de fluorescencia a alta intensidad..... 58

Figura 30. Líneas celulares *SH-SY5Y* tratadas con Peróxido de Hidrógeno 1000 μ M (H_2O_2) en el microscopio de fluorescencia..... 59



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Distribución de las diluciones en el Ensayo <i>Bca</i>	26
Tabla 2 Distribución de las muestras en El Ensayo De Caspasas 3.....	26
Tabla 3 Diseño para la siembra de los tratamientos en el Ensayo De EROS.....	30
Tabla 4 Valores obtenidos de las contracciones reales para el ensayo de caspasas.....	42
Tabla 5 Diluciones seriadas de los estándares y las absorbancias obtenidas mediante la medición del ensayo en el espectrofotómetro	42
Tabla 6 valores obtenidos de las contracciones reales para el ensayo de western blot.	43
Tabla 7 Diluciones seriadas de los estándares y las absorbancias obtenidas mediante la medición del ensayo en el espectrofotómetro.	44
Tabla anexa 1. Data cruda de absorbancias.....	92
Tabla anexa 2. Data cruda de absorbancias.....	92

RESUMEN

En la actualidad, a pesar del avance en la medicina, el uso de la medicina natural como agentes terapéuticos se ha convertido en una alternativa muy utilizada por parte de los pobladores de distintas comunidades en nuestro país. La maca (*Lepidium meyenii*) ha captado la atención por sus efectos beneficiosos para la salud. Esta planta posee en su composición metabolitos secundarios llamados macamidas los cuales se encuentran presentes en su raíz y se cree que tienen efectos neuroprotectores. Sin embargo, al no estar sujetas a estudios toxicológicos estas sustancias pueden ser tóxicas a determinadas concentraciones.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la citotoxicidad producida por las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida* en líneas celulares de neuroblastomas *SH-SY5Y*. Utilizando el pasaje 7 con una viabilidad celular de 95%, se estableció la concentración inhibitoria media (IC_{50}) de ambas macamidas sintéticas, obteniéndose una IC_{50} mayor para la macamida sintética *Metoxi-bencilinolenamida*. Además, se evaluó si la citotoxicidad inducida por estas macamidas sintéticas desencadenó la apoptosis mediante el ensayo de caspasa 3. Por último, se evaluó la presencia de las proteínas p53 (proteína supresora de tumores que activa la expresión de genes pro-apoptosis), PARP-1 (proteína activadora de muerte celular independiente de caspasa), Bcl-2 (proteína reguladora, marcador antiapoptótico) y LRP1 (Proteína de señalización relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad).

La IC_{50} encontrada para la macamida *N-bencilinolenamida* fue de 12.8 μM y de la *Metoxi-bencilinolenamida* fue de 53.3 μM evaluando un rango de concentraciones de 30 μM y 100 μM . Se confirmó la citotoxicidad producida por ambas macamidas sintéticas a partir de las concentraciones previamente mencionadas. También se encontró un incremento de las proteínas PARP-1 para la concentración 10 μM de la macamida *Metoxi-bencilinolenamida* y Bcl-2 para la concentración 10 μM de la macamida *N-bencilinolenamida*. La citotoxicidad provocada por estas macamidas sintéticas no activó la ruta metabólica caspasa 3 en la línea celular *SH-SY5Y*. Además, en las imágenes de microscopía de

fluorescencia se pudo observar que existía una pequeña presencia de especies reactivas de oxígeno (EROS) para ambas macamidas.

Palabras claves: *Lepidium meyenii*, macamidas sintéticas, citotoxicidad, SH-SY5Y, apoptosis.



ABSTRACT

At present, despite advances in medicine, the use of natural medicine as therapeutic agents has become a very suitable alternative for the inhabitants of different communities in our country. Maca (*Lepidium meyenii*) has attracted attention for its beneficial effects on health. This plant has in its composition secondary metabolites macamides which are present in its root and neuroprotective effects have been created. However, at the same time, they are not subject to toxic studies.

The objective of this investigation was to evaluate the cytotoxicity produced by the synthetic macamides *N-bencilinolenamide* and *Methoxy-bencilinolenamide* in neuroblastoma cell lines SH-SY5Y. Using passage 7 with a 95% cell viability, it is the mean inhibitory concentration (IC₅₀) of both synthetic macamides, obtaining a higher IC₅₀ for the synthetic macamide *Methoxy-benzylinolenamide*. In addition, the cytotoxicity induced by these synthetic macamides is evaluated and triggered apoptosis by means of the caspase 3 assay. Finally, the presence of proteins p53 (caspase-independent cellular activating protein), Bcl-2 (regulatory protein) is evaluated, antiapoptotic marker) and LRP1 (Protein signaling related to the low-density lipoprotein receptor).

The IC₅₀ was found for the macamide *N-benzylinolenamide* was 12.8 µM and for the *Methoxy-benzylinolenamide* was 53.3 µM to evaluate a range of responses of 30 µM and 100 µM. The cytotoxicity produced by both synthetic macamides was confirmed from the previously published ones. An introduction of the PARP-1 proteins was also found for the 10 µM concentration of the macamide *Methoxy-benzylinolenamide* and Bcl-2 for the 10 µM concentration of the macamide *N-benzylinolenamide*. The cytotoxicity caused by these synthetic macamides did not activate the metabolic pathway caspase 3 in the SH-SY5Y cell line. In addition, in the fluorescence microscopy images, it was observed that there is a small presence of reactive oxygen species (ROS) for both macamides.

Keywords: *Lepidium meyenii*, synthetic macamides, cytotoxicity, SH-SY5Y, apoptosis.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos inmemoriales el ser humano ha incidido en el uso de productos naturales para el tratamiento y curación de diversas enfermedades.

Esta práctica también ha sido utilizada en el Perú por nuestros antepasados, es así que históricamente tenemos vestigios antropológicos del cultivo y uso terapéutico de la maca, que han sido descritos en crónicas históricas.

Actualmente, en nuestro país la medicina viene incidiendo en el estudio, experimentación y uso de plantas con propiedades medicinales a través de la medicina alternativa, entre las que se encuentra considerada la maca.

Está demostrado que la raíz de la maca tiene propiedades alimenticias y medicinales, y viene siendo investigada debido a que se le atribuyen diversas propiedades benéficas para el sistema nervioso, en especial la memoria, así como las relacionadas con el estrés oxidativo, la fertilidad, mejora de los niveles de energía, la neuroprotección entre otros.

En vista de las afirmaciones efectuadas por la comunidad científica sobre los beneficios de la maca; en esta oportunidad hemos considerado realizar el estudio de dos macamidas sintéticas a fin de demostrar su posible citotoxicidad a nivel cerebral en líneas celulares de neuroblastoma (*SH-SY5Y*);

Nuestra hipótesis parte de la teoría “no todos los productos naturales son benéficos en su totalidad, estos podrían tener efectos negativos”, en tal sentido en coordinación con la Universidad Massachusetts College of Pharmacy and Health Science, y con apoyo del Dr. Alejandro Pino Figueroa, el Mgter Alejandro Rondón Ortiz y Nicholas Jakowenko se realizó esta investigación de citotoxicidad; esperando que con estos resultados y con una mayor investigación a futuro logremos descubrir mayores beneficios de esta raíz y reducir los posibles riesgos.

LISTA DE ABREVIATURAS

BAX: Proteína pro-apoptótica asociada a Bcl-2

Bcl-2: Proteína anti-apoptótica

PARP-1: Poli ADP ribosapolimerasa, isoforma 1

BSA: Albumina de suero bovino

DMSO: Dimetilsulfóxido

MTS:3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio

PBS: Buffer Fosfato Salino

SFB: Suero fetal bovino

IC50: Concentración inhibitoria media

M-PER: Reactivo de extracción de proteínas de mamíferos

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

RAGE: Productos finales de glicación avanzada

FAS: Receptor de muerte que conduce la apoptosis

Apaf1: Proteasa apoptótica activadora del factor 1

A β : Péptido β amiloide

LDL: Lipoproteína de baja densidad

ApoE: Apolipoproteína E

AIF: Factor de inducción a la apoptosis

Bid: Proteína proapoptótica perteneciente a la familia Bcl-2

ATP: Adenosin Trifosfato

HIPÓTESIS

Dado que estos metabolitos secundarios presentes en la maca poseen efectos terapéuticos, es probable que el efecto de dichos compuestos no sea tan amplio como se cree y presenten efectos negativos como la citotoxicidad a mayores concentraciones en células de neuroblastoma.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la citotoxicidad producida por las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida* en líneas celulares de neuroblastoma *SH-SY5Y*.

Objetivos específicos

1. Determinar el IC_{50} de las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida*.
2. Evaluar si las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida* inducen la formación de radicales libres
3. Evaluar si las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida* inducen la apoptosis en las líneas celulares de neuroblastoma *SH-SY5Y*.
4. Evaluar si las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida* inducen la expresión de las proteínas p53, PARP-1, LRP1.
5. Evaluar si las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida* inducen la producción de la proteína Bcl-2 en las líneas celulares de neuroblastoma *SH-SY5Y* como mecanismo de defensa.



MARCO TEÓRICO

1 1. MACA (*Lepidium meyenii*.)

1.1.1. CARACTERÍSTICAS

Pertenece al género *Lepidium*, a la familia *Brassicaceae* (*Cruciferae*)⁽¹⁾. La maca aparece esencialmente en la fase vegetativa como una pequeña roseta de hojas que se hace más grande en la fase generativa. Está compuesta de hojas, flores y una raíz generalmente de forma cónica como se observa en la Figura 1. Su raíz puede alcanzar una longitud de aproximadamente 18 cm y un diámetro de aproximadamente 6,5 cm⁽¹⁾.

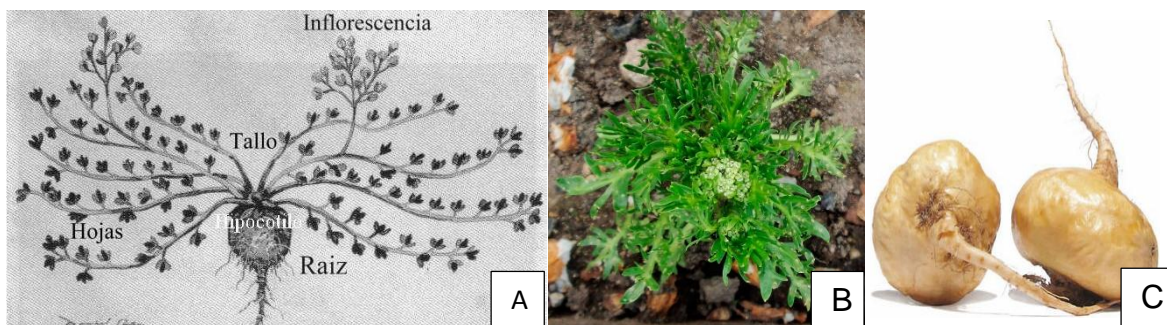


Figura 1. Características de *Lepidium meyenii*: A) morfología B) roseta de hojas y C) raíz cónica⁽²⁾.

1.1.2. CONDICIONES DE CRECIMIENTO

L. meyenii es una planta endémica cultivada en zonas andinas que puede ser expuesta a alta radiación y frecuentes heladas sin ningún problema. Por lo que las bajas temperaturas son de gran importancia para el crecimiento de este cultivo de alta montaña⁽³⁾.

Su cosecha se da en las zonas altas de los Andes centrales, desde el centro del Perú hasta Bolivia y extendiéndose el noroeste de Argentina. Los especímenes peruanos de esta planta son cultivados en los pastizales de la puna de los

departamentos de Cusco, Junín, Moquegua, Pasco y Puno ⁽²⁾. Es una planta que solo se encuentra en las mesetas (3800-4800 msnm) ⁽⁴⁾.

1.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Diversos estudios han mostrado que esta planta contiene glucosinolatos, alcaloides, macamidas y otros, lo que probablemente ayude a explicar la variedad de actividades biológicas atribuidas a la maca. Su composición química muestra un alto contenido en aminoácidos esenciales por lo que su densidad de grasa es más alta que la encontrada en otras raíces. Después de la hidrólisis alcalina la fracción de ácidos grasos, se caracteriza por la presencia de compuestos insaturados, entre ellos ácido linoleico (32,6%) como componente principal, seguido de ácido palmítico (23,8%) y ácido oleico (11,1%) ⁽⁵⁾.

1.1.4. PROPIEDADES TERAPÉUTICAS

Para los pueblos indígenas es un alimento dietético importante por su riqueza en carbohidratos, lípidos y proteínas. Además, se dice que tiene propiedades que incluyen la regulación de la secreción hormonal, la inmunoestimulación, la mejora de la memoria, los antidepresivos, el anticancerígeno y la eficacia para curar la anemia, los trastornos menstruales y sexuales ⁽⁶⁾. Sin embargo, la evidencia científica mostró que posee efectos sobre el comportamiento sexual, la fertilidad, el estado de ánimo, la memoria y el tratamiento de varias entidades tumorales ⁽⁷⁾.

1.2. MACAMIDAS

En la raíz de maca se encuentran presentes un grupo de metabolitos secundarios llamados macamidas. Estos metabolitos son ácidos grasos poliinsaturados, considerados marcadores químicos porque no han sido encontrados en otra especie de *Lepidium* ⁽⁸⁾. Todas las macamidas son N-

bencilamidas, algunas son amidas de ácidos grasos saturados (C8 y C15-18), mientras que otras son derivadas de los ácidos grasos insaturados comunes C18. En su composición poseen ácidos grasos como el ácido oleico, linoleico y linolénico ⁽⁹⁾.

Las macamidas presentan polaridad, estudios previos demostraron que estos residen en los extractos no polares de la planta ⁽¹⁰⁻¹²⁾ y tiene la tendencia de co-eluir con compuestos que posee polaridad similar, como los ácidos linoleico y linolénico (cuyas fórmulas químicas se muestran en la Figura 2), los cuales constituyen el 60% en el total de ácidos grasos insaturados presentes en la maca ⁽⁵⁾.

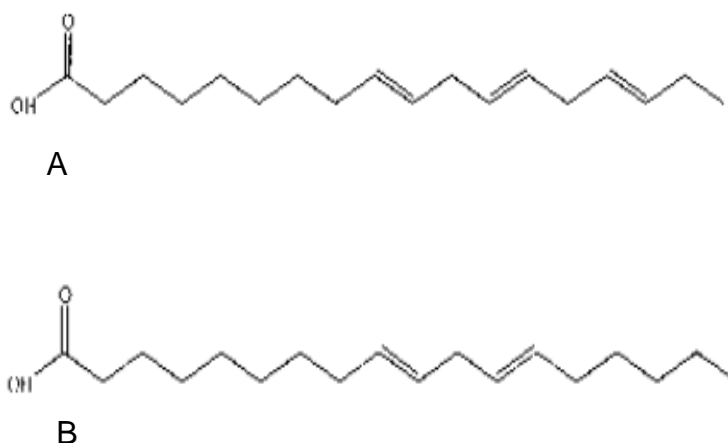


Figura 2. Estructuras químicas de algunos ácidos grasos presentes en las macamidas. A) Ácido linolenico B) Ácido linoleico ⁽¹³⁾.

1.2.1. SÍNTESIS DE MACAMIDAS

La síntesis de las macamidas fue realizada por el grupo de la investigación del Dr. Alejandro Pino Figueroa. Dicha síntesis se llevó a cabo haciendo reaccionar el ácido carboxílico precursor con 1,10-carbonildiimidazol (CDI). Las soluciones de los intermediarios de N-acilimidazol resultantes se añadieron al amoniaco o la bencilamina apropiada ⁽⁹⁾.

Las macamidas sintéticas usadas en esta investigación presentan en su estructura química un ácido graso el cual es el linolenico como se puede observar en la Figura 3.

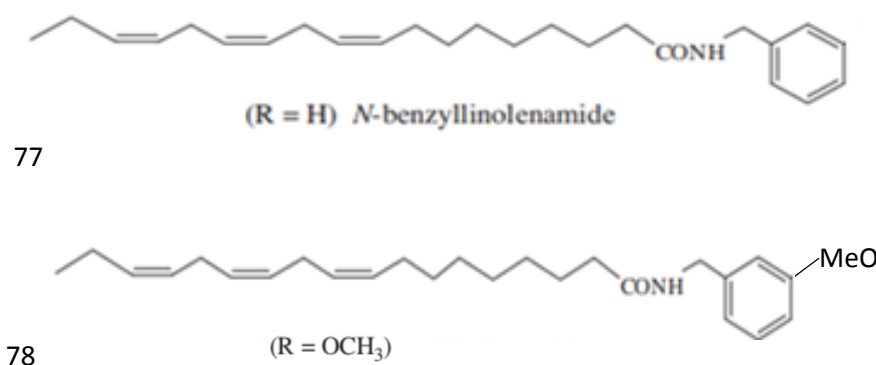


Figura 3. Fórmula química de las macamidas *N*-benzyl linolenamida y Metoxibenzyl linolenamida ⁽⁹⁾.

1.2.1. NEUROPROTECCIÓN DE LAS MACAMIDAS

La reducción del estrés oxidativo celular inducida por H₂O₂ *in vitro* por el extracto pentanoico de *L. meyenii* sobre neuronas de langosta respalda la sugerencia de que este producto natural tiene posibles propiedades neuroprotectoras ⁽¹⁴⁾.

Las evaluaciones microscópicas y los ensayos de viabilidad celular revelaron una reducción en el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ en las células tratadas con el extracto de esta planta. Además, el ensayo de viabilidad celular demostró una correlación lineal significativa entre la concentración del extracto de pentano y el porcentaje de neuroprotección, que oscila entre el 6,7% a 87,9% para las concentraciones 30 g / mL a 0.1 g / mL respectivamente del extracto pentanoico ⁽¹¹⁾.

Sin embargo, la maca posee muchos compuestos de los cuales no se tiene estudios de sus propiedades beneficiosas.

1.3 CULTIVOS CELULARES

El cultivo celular es una técnica de remoción de células animales o vegetales para su crecimiento en un entorno artificial favorable para su desarrollo ⁽¹⁷⁾. Cada tipo de célula posee diferentes condiciones de cultivo, teniendo en cuenta que el entorno artificial debe realizarse en un recipiente con un sustrato o medio que suministre los nutrientes esenciales (vitaminas, aminoácidos, carbohidratos, y minerales), hormonas, gases (O_2 , CO_2), factores de crecimiento y un entorno fisicoquímico adecuado (temperatura, pH, presión osmótica, entre otros) ^(15,16).

El cultivo celular es de gran importancia en el entorno científico ya que proporciona un excelente modelo de sistema para poder estudiar la fisiología y la bioquímica de las células *in vitro*, también los efectos de las drogas experimentales, compuestos tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos. La principal ventaja de esta técnica es brindar la reproducción de los resultados ⁽¹⁸⁾.

1.3.1. LÍNEA CELULAR *SH-SY5Y*

Las células *SH-SY5Y* provienen de la línea celular parental de neuroblastoma *SK-N-SH*, la cual se estableció en 1970 en base a una biopsia de médula ósea. Esta línea celular tiene un cariotipo con 47 cromosomas ⁽¹⁷⁾.

Varios estudios han notado diferencias importantes entre las células *SH-SY5Y* en sus estados indiferenciados y diferenciados. Cuando estas son indiferenciadas, proliferan rápidamente y parecen no polarizadas, con muy pocos procesos cortos, crecen en grupos y expresan marcadores indicativos de neuronas inmaduras ^(17,18). Cuando se diferencian, estas células extienden largos procesos ramificados, disminuyen la proliferación y en algunos casos se polarizan ^(17,19).

1.4. CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR

El conteo celular puede ser usado para el monitoreo de cultivos, niveles de proliferación y transformación de las células a lo largo de las investigaciones.

Hay que tener en cuenta que los conteos celulares deben ser precisos, consistentes y rápidos, para monitorear respuestas celulares de manera cuantitativa.

El conteo celular puede realizarse de dos formas, es decir, mediante métodos manuales (conteo en cámara) o automáticos (contadores electrónicos).

Para realizar el conteo y ver la viabilidad (medir la proporción de células vivas) se debe emplear colorantes; el más utilizado es el azul de Tripán.

1.4.1 MÉTODO DE AZUL DE TRIPÁN

El azul de Tripán es utilizado para realizar tinciones vitales en el análisis celular y se emplea en exámenes histológicos en la medicina. Es un colorante anicónico derivado de toluidina, tiene la capacidad de teñir tejidos o células muertas mediante la exclusión de captación, es decir, que este no penetra las células vivas que tienen la membrana totalmente integrada, por lo tanto, no las tiñe. En contraste con las células muertas, las cuales si son penetradas por su membrana dañada. En tal sentido este colorante es utilizado para diferenciar las células vivas y las células muertas ⁽²⁰⁾.

1.4.2 ENSAYOS DE REDUCCIÓN DE TETRAZOLIO

Estos ensayos se usan para comprobar si las moléculas que se desean probar tienen efectos sobre la proliferación celular, efectos citotóxicos o muerte celular.

Son métodos colorimétricos para la cuantificación sensible de células viables. Pueden utilizarse para evaluar la proliferación celular, la viabilidad y la citotoxicidad.

La reducción del tetrazolio mide una actividad enzimática o el metabolismo general como marcador de células viables. Estos ensayos requieren de la incubación del reactivo con células viables para transformar un sustrato en un producto coloreado que se pueda detectar ⁽²¹⁾.

Cuando una célula muere, pierde la capacidad de convertir un sustrato en producto. Esta diferencia es la que proporciona la base para los ensayos de viabilidad celular.

1.4.2.1. MÉTODO MTS

El reactivo MTS es una sal que da lugar a compuestos de formazán solubles en agua. El MTS se reduce con las células viables generando un producto formazán, el cual es soluble en el medio de cultivo celular, por lo tanto, la metabolización del compuesto MTS por enzimas deshidrogenasas dependientes de NADPH es directamente proporcional al número de células viables. El colorante de formazán se cuantifica midiendo la absorbancia a 490-500 nm ⁽²¹⁾.

El protocolo de ensayo MTS se realiza agregando el reactivo MTS directamente en el medio de cultivo celular, sin los pasos intermitentes que se requieren en el ensayo de rutina MTT ⁽²²⁾.

Este ensayo elimina una etapa de manejo del líquido durante su procedimiento porque no se necesita una segunda adición de reactivo a la placa de ensayo para solubilizar los precipitados de formazán

1.4.2.2. METODO MTT

El ensayo de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) no es directamente soluble en el medio de cultivo celular a diferencia del MTS. Se prepara con una solución que es agregada a las células en cultivo y se incuba

de 1 a 4 horas. El formazán se acumula como un precipitado no soluble dentro de las células y este se deposita cerca de la superficie celular. El formazán debe solubilizarse antes de realizar la lectura de las absorbancias ⁽²¹⁾. La cantidad de formazán formada es directamente proporcional al número de células viables y se mide a 570 nm utilizando un espectrofotómetro para visualizar sus cambios.

Las células viables que poseen su metabolismo activo transforman el MTT en formazán (color púrpura), pero cuando las células mueren, pierden esta capacidad ⁽²²⁾.

1.5. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR

1.5.1. NECROSIS

Este tipo de muerte celular se produce cuando existen agentes externos, un traumatismo o por falta de nutrientes en la célula. La necrosis consiste en el aumento de volumen celular, lo que altera la membrana plasmática y mitocondrial produciendo una bomba de iones (que son el mecanismo de defensa de la célula). Si estos no son suficientes entonces la célula entra en estado de turgencia destruyendo la membrana plasmática. Una vez destruida la membrana plasmática, los organelos comienzan a romperse y se descomponen provocando el lisado de la célula. Ocurrido el lisado, se elimina el contenido intracelular y se produce inflamación por una respuesta inmune. En la Figura 4, se puede observar la diferencia entre las rutas de muerte celular necrosis y apoptosis ^(23,24).

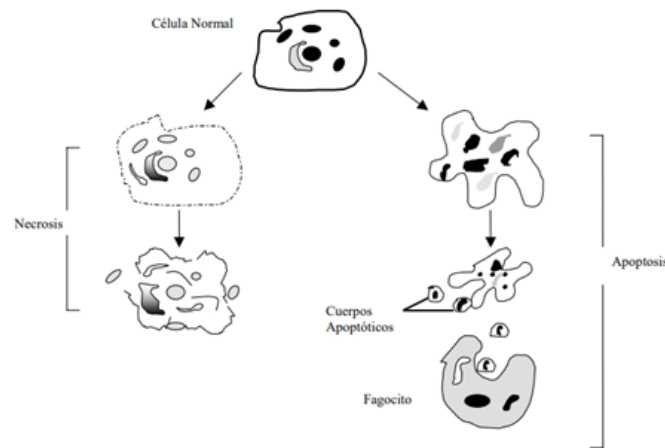


Figura 4. Diferencias entre la apoptosis y necrosis (25).

1.5.2 APOPTOSIS

La apoptosis, muerte celular programada, es un proceso de muerte celular que toma lugar dentro de la misma célula, el cual está caracterizado por cambios bioquímicos o morfológicos de las células. Este se puede dar de forma natural durante el desarrollo embrionario o durante el desarrollo del sistema inmunitario, donde las células T son eliminadas por su inmunodeficiencia. Otra razón para la apoptosis, es cuando se desea eliminar una célula que se encuentra dañada para destruir los agentes peligrosos y de esta manera no dañen otras células. La apoptosis se puede dar en diferentes vías: la vía intrínseca, la vía extrínseca y por el factor de inducción a la apoptosis (AIF) (26).

La vía intrínseca (o también llamada ruta mitocondrial) inicia y tiene lugar dentro de la célula específicamente en la mitocondria y se da por estímulos intracelulares. En la mitocondria celular se encuentra la proteína inhibitoria de la apoptosis llamada Bcl-2. La vía comienza cuando existe algún tipo de daño genético, p53 recibe las señales del daño genético y se encarga de estimular a BAX, que es una proteína encargada de inhibir Bcl-2 y crear agujeros en la membrana mitocondrial. Por los agujeros creados, el citocromo C es liberado al citosol donde se une con la proteína Apaf-1 formando el apoptosoma. El cual activa y se une a la pro-caspasa 9 formando el complejo caspasa 9 activa. Esta

caspasa se encarga de activar la caspasa 3 para romper los organelos y ADN provocando la apoptosis (27,28).

El apoptosoma es complejo molecular formado por la pro-caspasa 9 y la proteína Apaf1. Este complejo se encuentra en vertebrados, pero existen proteínas ortólogas que tienen mecanismos ligeramente diferentes en eucariotas inferiores (29,30).

La vía extrínseca, a diferencia de la vía intrínseca, inicia afuera de la célula y tiene lugar dentro de la célula, es decir esta vía comienza con un estímulo extracelular pero la apoptosis toma lugar intracelularmente. Las células tienen un receptor de muerte llamado FAS y activadores de muerte llamados FAS-L. Cuando se juntan FAS y FAS-L se forma un complejo de muerte el cual se encarga de activar a la caspasa 8. Una vez activada la caspasa 8, se activa la caspasa 3 la cual continúa el proceso apoptótico destruyendo la célula y el ADN (26,28).

En los dos tipos de vías (intrínseca y extrínseca) se activa la caspasa 3, la cual activa proteasas y nucleasas que se encargan de desintegrar la célula. Con la célula convertida en débris, ocurre la fagocitosis. En la Figura 5, se observa las dos vías apoptóticas tanto intrínseca como extrínseca, las proteínas que intervienen en la activación, propagación y por último la ejecución. (31)

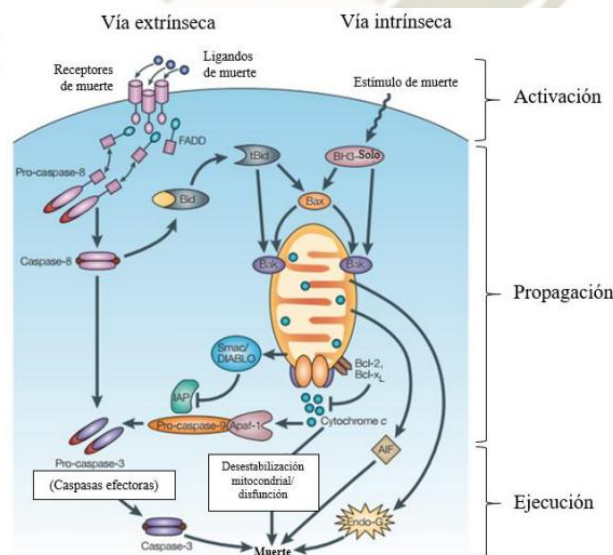


Figura 5. Vías de la apoptosis (26).

1.5.3. PARTHANATOS

La muerte celular llamada Parthanatos es la que ocurre por la sobreexpresión de la proteína PARP-1, provocando la fragmentación del ADN a gran escala y la condensación de la cromatina, lo que lleva a la muerte celular. Esta vía no requiere de la mediación de las caspasas y está asociada a los eventos bioquímicos de activación rápida de PARP-1, síntesis y acumulación de PARP, despolarización mitocondrial y translocación de AIF nuclear ⁽³²⁾.

1.5.4 AUTOFAGIA

La muerte celular llamada Autofagia se produce por la degradación intracelular (componentes citoplasmáticos) en los lisosomas. Esta vía consta de varias etapas, las cuales son inducción, formación del autofagosoma, transporte a lisosomas, degradación y reciclaje. Existen tres tipos de autofagia los cuales son la macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperones ⁽³³⁾. En la Figura 6, se encuentra desarrollado el proceso de la autofagia.

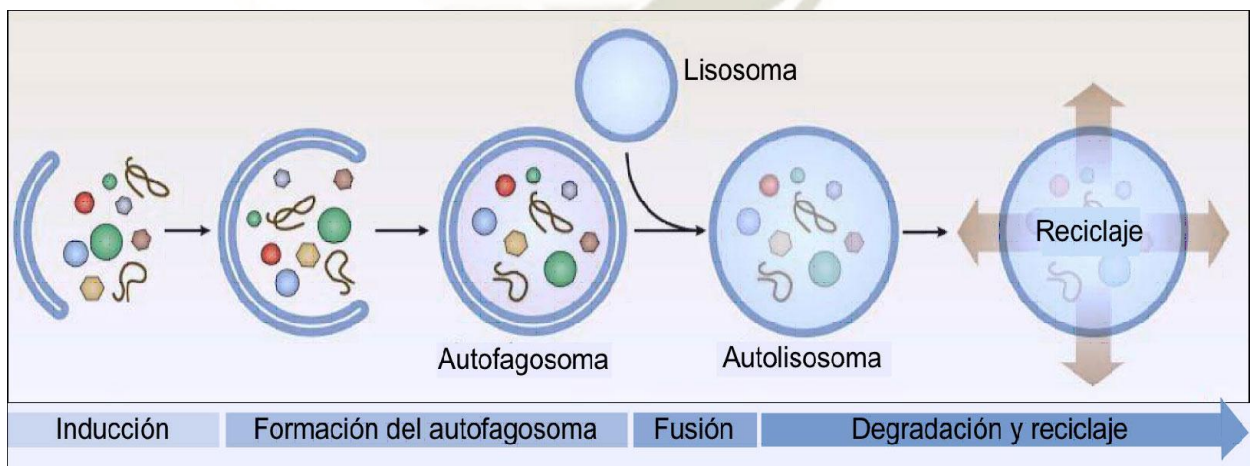


Figura 6. Proceso de Autofagia ⁽³⁴⁾.

1.6 ACTIVIDAD DE CASPASA 3

Las caspasas son enzimas especializadas, las cuales son proteasas de serina. La forma activa de las caspasas se utiliza como marcador en la apoptosis. Estas son las ejecutoras de la apoptosis ya que la activan este mecanismo frente a cualquiera el estímulo. Las formas inactivas de estas se llaman procaspasas las cuales contienen tres dominios diferentes: el primero es pro-dominio N-terminal, el segundo es la subunidad grande y el último es la subunidad pequeña. En la apoptosis se pueden encontrar dos diferentes tipos de caspasas, están las iniciadoras que son activadas por un estímulo apoptótico, y las efectoras que son activadas por la proteólisis que es iniciada por las caspasas iniciadoras. En las vías de apoptosis, tanto intrínseca como extrínseca, coinciden en la activación de caspasas iniciadoras y de las ejecutoras. Las iniciadoras son la caspasa 9 para la vía intrínseca y las caspasas 8 y 10 para la vía extrínseca.

Las caspasas efectoras para ambas vías son la caspasa 3 y la 7 ^(27,35-37).

1.7 FAMILIA Bcl-2

La familia de Bcl está compuesta por proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bid) y anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-X). Bcl-2 es una proteína anti-apoptótica que pertenece a la familia Bcl. Esta proteína se encuentra en la membrana mitocondrial externa ⁽³⁸⁾ o en el citoplasma controlando a las pro-apoptóticas (citocromo c).

El apoptosoma se encuentra en la vía intrínseca y se encuentra constituido por Apaf 1, caspasas 9 y citocromo C ⁽³⁹⁾. Este apoptosoma está controlado por la familia Bcl-2, limitando su formación por las proteínas anti-apoptóticas ^(27,31).

1.7.1 PROTEÍNA BAX

Como se ha descrito anteriormente, Bax es una proteína pro-apoptótica la cual actúa en la vía intrínseca, y es activada por p53 ⁽⁴⁰⁾. Una vez activada, se encarga de introducirse y crear canales en la mitocondria para la liberación del citocromo C para que se pueda formar el apoptosoma y finalizar con la apoptosis ⁽³¹⁾.

1.8 PROTEÍNA p53

La proteína p53 (proteína supresora tumoral) tiene una función de factor de transcripción. Se encarga de controlar la reparación del ADN, la apoptosis y la regulación del ciclo celular. La acción de p53 en el ciclo celular consiste en la reparación del mismo, si existe algún tipo de daño lo que ocurre con el aumento de p53, deteniendo el ciclo celular hasta que el daño sea reparado. Si se mantiene altas concentraciones de p53 por un largo tiempo o el daño es irreversible, entonces p53 promueve la apoptosis activando BAX. Como se sabe la sobreexpresión de Bcl-2 inhibe la apoptosis, es por eso que también se encarga de inhibir el efecto de p53. En la literatura existen referencias sobre la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) inducidas por p53 para provocar la apoptosis por la vía intrínseca ⁽⁴⁰⁾.

Si existe algún tipo de mutación en este gen, pierde su efecto de apoptosis y reparación en el ciclo de celular. Sin reparación, las células se siguen produciendo con el daño adquirido. Este suceso provoca enfermedades como el cáncer ^(26,31).

1.9 PROTEINA LRP1

La proteína LRP1 se encuentra relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL). LRP1 es un receptor eliminador que pertenece a la familia

de receptores LDL y tiene la función de mediar la eliminación y reciclaje de muchos ligandos estructurales y funcionalmente diferentes a través de un receptor endocítico; también es un metabolizador de colesterol y apolipoproteína E (apoE).

LRP1 se encarga de unir una amplia gama de ligandos, los cuales incluye apoE, *α -macroglobulina*, precursores de la proteína amiloide A β . Estos receptores son altamente expresados en el cerebro y en el hígado. Por lo tanto, cuando existe un cambio en la regulación de la expresión de LRP1 se asocia con patologías como por ejemplo la aterosclerosis, Alzheimer y tumores ^(41,42).

Existen otros miembros de la familia de estos receptores (LDr) los cuales juegan un rol importante en muchos procesos biológicos, como desarrollo y metabolismo de lipoproteínas, la señalización celular, modulación de la integridad de la barrera hematoencefálica, coagulación sanguínea y fibrinólisis. ^(43,44) El transporte de A β desde el torrente sanguíneo hacia el cerebro es mediado por RAGE ⁽⁴¹⁾, y desde el cerebro hacia el torrente sanguíneo es mediado por LRP1. El flujo neto de A β dentro y fuera del cerebro depende de la densidad y actividad de estos dos receptores ^(42,43).

1.10 PROTEÍNA PARP-1

PARP-1 (*poli ADP-ribosa sintetasa*) es una proteína nuclear que tiene tres dominios. Su dominio de unión al ADN con dos dedos de zinc cumple la función de unir PARP-1 con alguna ruptura de una hebra. El zinc es indispensable para la unión del ADN y de PARP-1 ⁽⁴⁵⁾.

La sobreexpresión de PARP-1 conlleva a la producción de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido) y el agotamiento de ATP. Como se sabe esta proteína se encuentra relacionada con la apoptosis, la necrosis y parthanatos.

En la Figura 7, se puede observar las diferentes rutas de muerte celular en las que PARP-1 está incluida tanto en la apoptosis, parthanatos, necrosis y autofagia ⁽⁴⁶⁾.

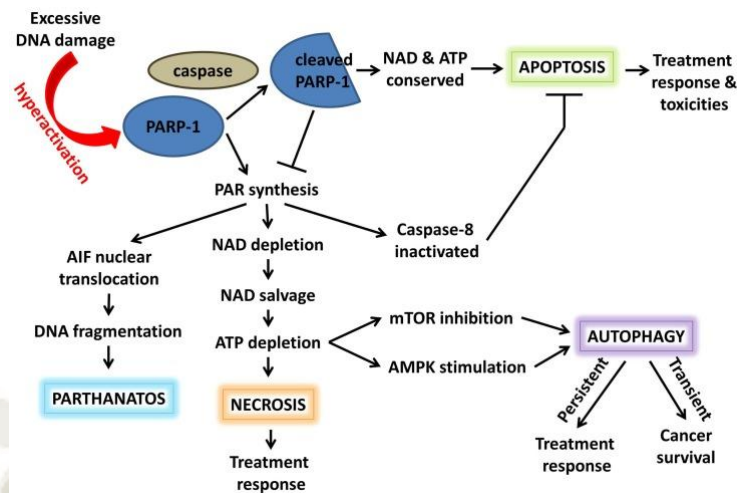


Figura 7. Procesos celulares en los cuales PARP-1 está involucrada (47).

1.11 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROS)

Las especies reactivas de oxígeno (EROS) son un producto secundario del metabolismo aeróbico de las células, dentro de este grupo se incluyen el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilos (OH^\cdot). A medida que se forma ROS, se vuelven muy inestables debido al electrón no apareado que se encuentra en la capa más externa y se produce la formación de los radicales libres. Su sobreexpresión se asocia con el estrés oxidativo lo que sugiere que estas inducen patología al causar daño a los lípidos, las proteínas y el ADN (48-50).



1. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

- Líneas celulares de neuroblastoma *SH-SY5Y* (ATCC® CRL-2266™), pasaje 6 y 7.
- Macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida*, donadas por el laboratorio del Dr. Alejandro Pino Figueroa.

2.1.2. MEDIOS DE CULTIVO

- Dulbecco's Modification of Eagle's Medium with 4.5g/L glucose, L-glutamine and sodium pyruvate (CORNING cellgro).
- Dulbecco's Modification of Eagle's Medium with 4.5g/L glucose, L-glutamine and without sodium pyruvate (CORNING cellgro).
- Medio phenol free DMEM (CORNING cellgro).

2.1.3. MATERIAL DE LABORATORIO

- Pipetas desechables 5, 10, 25 mL (VWR)
- Micropipetas 10, 100, 200, 1000 µL (VWR)
- Micropipetas Multichanel (VWR)
- Accu-jet (Pro BRAND)
- Tubos de micro centrífuga (Eppendorf™)
- Tubos falcon (Thermoscientific™)
- Tips de 10, 100, 200, 1000 µL (VWR)

- Frascos de cultivo celular 40, 250 y 500 mL (VWR)
- Microplatos de 6 y 96 pocillos (VWR)
- Microplatos de 96 pocillos poly-D-lysine-coated surfaces (VWR)
- Termómetros electrónicos (VWR)
- Scraper (VWR)
- Gradillas para tubos de microcentrifuga (VWR)

2.1.4. EQUIPOS DE LABORATORIO

- Balanza analítica (VWR)
- Cámara de flujo laminar (VWR)
- Vortex (VWR)
- Plataforma de agitación (VWR)
- Fuente de Poder (Bio-rad)
- Espectrofotómetro (Biotek)
- Contador celular Cellometer (Nexcelom)
- Refrigeradoras -20, -80, -4 °C (VWR)
- Incubadora de crecimiento celular 37 °C y 5% CO₂ (VWR)
- Incubadora 37 °C (VWR)
- Centrifugadora (VWR)
- Hotplate (VWR)

2.1.5. REACTIVOS

- Kit BCA (Thermofisher)

- Kit Caspasa 3/7 (Bio Vision)
- Kit EROS (Thermofisher)
- Kit de Electroforesis (Thermofisher)
- Kit Western Blot (Thermofisher)
- Kit MTS (Promega)
- Kit de Lisis Celular (Thermofisher)
- Kit de Viabilidad celular (Promega)
- Tripsina (CORNING)
- PBS estéril (CORNING cellgro)
- Azul de Tripán (CORNING)
- Penicilina (CORNING)
- Peróxido de Hidrogeno (Thermoscientific™)
- FBS (CORNING cellgro)

2.1.6. OTROS

- Cubetas para hielo (VWR)
- Temporizador (VWR)

2.2. MÉTODOS

2.2.1. OBTENCIÓN DE LAS MACAMIDAS

La síntesis de las macamidas fue realizada por el grupo de investigación perteneciente a la Universidad *Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences* (MCPHS) y fue donado para esta investigación.

Las macamidas sintéticas se encontraban a -20°C en viales transparentes. Las características organolépticas observadas para el caso de la macamida sintética *N-bencilinolenamida* fue que presentaba una textura oleaginosa mayor a la macamida sintética *Metoxi-bencilinolenamida*, ambas eran incoloras e inodoras.

2.2.2. CULTIVO CELULAR

2.2.2.1. MEDIOS DE CULTIVO

Para el desarrollo de esta investigación fue necesario el medio de cultivo completo DMEM debido a que según referencias es el medio que permite un crecimiento más rápido y también una mejor adherencia a la línea celular utilizada *SH-SY5Y* ⁽²²⁾.

Para ensayos posteriores se usó un medio bajo en suero para que el cultivo celular se encuentre estable, es decir no haya más crecimiento celular durante la exposición a las drogas.

Se preparó medio completo mezclando DMEM 1X con 5 mL de penicilina/estreptomicina para evitar el crecimiento de microorganismos y 50 mL de suero fetal bovino el cual le apporto los nutrientes para su crecimiento (10% SFB) hasta llegar a un volumen final de 500 mL.

También, se preparó medio bajo en suero mezclando 500 mL de DMEM 1X con 5 mL de penicilina/estreptomicina y 5 mL de suero bovino fetal (1% SFB).

2.2.2.2. DESCONGELAMIENTO DE LAS CÉLULAS

Se retiró el criovial con las células del contenedor de nitrógeno líquido y se llevó a baño termostático de 37°C hasta que se descongele el contenido y no quede ninguna partícula de hielo presente, lo cual demoró 10 minutos. El sistema fue llevado a una cabina de flujo laminar la cual fue previamente esterilizada con luz UV y etanol al 70% para evitar la contaminación y tener un ambiente estéril. Para empezar con el protocolo se transfirió el contenido del criovial a un tubo de microcentrífuga y se añadió medio completo a 37°C; se procedió a centrifugar a 800 rpm por 5 minutos, después se decantó el sobrenadante y el precipitado de células se resuspendió en medio completo para evitar la formación de agrupación celular. A continuación, se transfirió a un frasco de cultivo, añadiéndose más medio completo al frasco de cultivo (25 mL) y se dejó en una incubadora de cultivo a condiciones de 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad.

2.2.2.3. SUBCULTIVO CELULAR

Se realizó el subcultivo celular cada vez que se observó bajo el microscopio óptico invertido (10X de aumento) que el frasco de cultivo celular se encontraba con un 80 - 90% de confluencia de células de neuroblastoma (tiempo de incubación una semana) para obtener mayor cantidad de proteínas y para promover la conservación de las células para futuros ensayos.

El subcultivo se realizó mediante el decantamiento del medio de cultivo, se lavó con PBS (la cantidad depende del tamaño del frasco de cultivo que se esté utilizando), en nuestro caso para los frascos de 75 cm² se utilizó 10 mL y para los de 25 cm² se utilizó 3 mL. Se incubó con tripsina a 37 °C por 5 minutos para que se despeguen las células. Luego, se inhibió la tripsina con medio de cultivo sin SFB (el doble que la de tripsina), se transfirió la mezcla a un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugó a 800 rpm por 5 minutos. A continuación, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado de células con 1mL de medio de cultivo completo (la resuspensión se realizó 10 veces). Se colocó la cantidad de medio de cultivo completo dependiendo del ensayo a realizar y lo sobrante se

sembró en un frasco de cultivo nuevo y debidamente rotulado agregándole la cantidad necesaria de medio de cultivo completo (20 mL para el frasco de 75 cm²).

Para el tratamiento con las macamidas sintéticas (*N-bencil-linolenamida* y *Metoxi-bencil-linolenamida*) se utilizó el medio *DMEM* con 1% de penicilina, pero con bajo porcentaje de suero fetal bovino.

2.2.2.4. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

Una vez conseguida la confluencia celular en los frascos, se procedió a tripsinar, despegar y centrifugar como se mencionó anteriormente para realizar el conteo celular y colocar el mismo número de células por pozo para poder evaluar el efecto de las macamidas sintéticas ya mencionadas.

A continuación, se realizó una suspensión 1:1, es decir 50 μ L de suspensión de células obtenidas a partir del pasaje 6 de células con 50 μ L de azul de tripán los cuales se colocaron en un tubo de microcentrifuga, el contenido se resuspendió y se colocó 20 μ L en una lámina portaobjetos, la cual se llevó al *cellometer* señalando el ensayo para que se realice el conteo, mediante la opción "*Display image*" del Software Nexcelom se enfocó la lámina y se seleccionó "*Count*". Se repitió el proceso dos veces cambiando de lado a la lámina y se obtuvo un promedio de ambas lecturas de viabilidad celular.

Luego del conteo celular, se sembró 500 mil células por pozo en los platos de 96 pocillos y se dejó incubando por 24 horas en medio completo *DMEM*, pasada las 24 horas se cambió el medio completo por un medio bajo en suero por otras 24 horas para que las células detengan su crecimiento y se aclimaten a este tipo de medio, ya que el tratamiento con las macamidas sintéticas se realiza en este medio. El tratamiento se realizó con la aplicación de ambas macamidas sintéticas en medio bajo en suero con las siguientes concentraciones: 0,1 μ M, 0,3 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M y 100 μ M, además se empleó un control el cual contenía solo medio bajo en suero. Luego de las 24 horas de aclimatación, se procedió a aplicar el tratamiento previamente mencionado por 24 horas. Terminada la exposición al tratamiento, el reactivo MTS (Promega) se diluyó con medio bajo

en suero (2 mL de MTS y 18 mL de medio bajo en suero), colocándose 200 μ L de la dilución por cada pocillo, se incubó a 37 °C por 5 horas. Terminado el tiempo de incubación, el microplato fue analizado en el espectrofotómetro ($\lambda=492$ nm). Luego se realizaron los ensayos estadísticos con la data obtenida (ensayo *one-way Anova* y el ensayo de *post hoc Tuckey*).

2.2.4. DETERMINACIÓN DE LA IC₅₀

La estimación de la IC₅₀ se llevó a cabo usando el software computacional estadístico *GraphPad Prism 6*. Se realizó teniendo en cuenta el ensayo de viabilidad celular ya que con los datos obtenidos se construyó una curva de calibración al relacionar las absorbancias obtenidas vs la concentración de las macamidas sintéticas.

2.2.5. LISIS CELULAR

Se sembró un millón de células del pasaje 7 en platos de cultivo de 6 pocillos utilizando medio completo por 24 horas. Luego de las 24 horas, se cambió el medio de cultivo completo *DMEM* por un medio bajo en suero para detener el crecimiento de las células y conseguir su aclimatación por 24 horas. Posteriormente, las células fueron tratadas con ambas macamidas sintéticas previamente preparadas a concentración 10 μ M, 30 μ M y 100 μ M en medio bajo en suero, además se preparó un control el cual contenía solo células con medio bajo en suero.

A continuación, en la Figura 8 se muestra la distribución de dos platos de 6 pocillos los cuales contenían las células *SH-SY5Y* con el tratamiento de las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida*, incluyendo un control que solo tenía células en medio bajo en suero.

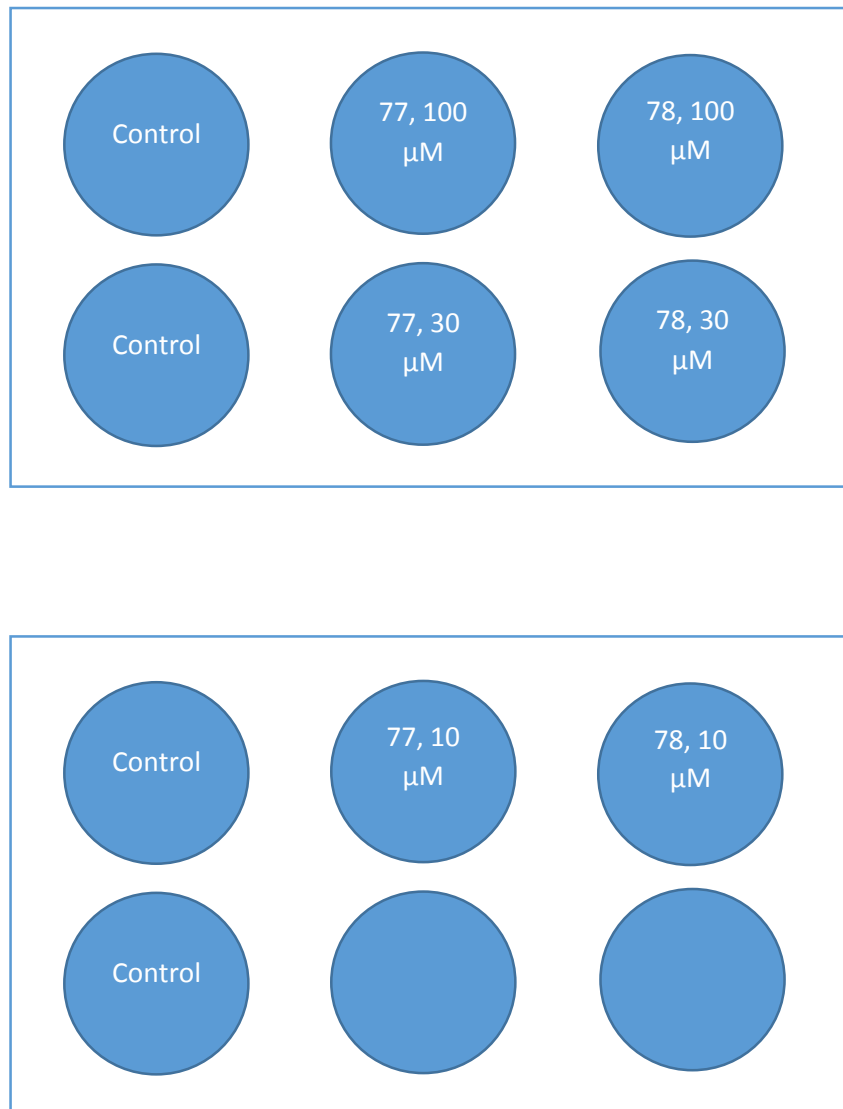


Figura 8. Distribución de los platos de 6 pocillos.

Se utilizó solo concentraciones 10 μM , 30 μM y 100 μM para este ensayo debido a que en ensayos previos no se obtuvo resultados significativos a concentraciones más bajas.

Al finalizar las 24 horas de incubación, el plato fue colocado en una cubeta de hielo para evitar la degradación de las proteínas, se procedió a lavar dos veces con PBS frío (4°C) y se agregó 300 μL de reactivo de lisis celular *MPER* por pocillo, se dejó en reposo por 5 minutos para que el reactivo pueda extraer las proteínas citoplasmáticas y nucleares del cultivo ⁽⁵¹⁾, seguidamente se raspó el fondo de cada pocillo con un rascador de células, inclinando el plato ligeramente

a un lado, para que el contenido del raspado este suspendido en el *MPER*. Se debe raspar cada pocillo hasta que no se vea la presencia de las células en el fondo. Con una micropipeta se transfirió el contenido de cada pocillo a tubos de microcentrífuga rotulados y se centrifugó a 4°C por 5 min para precipitar los restos celulares. Finalmente, se transfirió el sobrenadante de cada tubo a nuevos tubos de microcentrífuga rotulados, los cuales fueron conservados a -80°C.

2.2.6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN LISADOS CELULARES

Las muestras de proteínas obtenidas previamente en el lisado celular fueron descongeladas para ser cuantificadas utilizando el ensayo *BCA* (Thermofisher), se utilizó el protocolo de Pierce proporcionado por la empresa Thermofisher ⁽⁵²⁾. Las diluciones de los estándares de la proteína albumina fueron realizadas a concentraciones 2000 μM , 1500 μM , 1000 μM , 750 μM , 500 μM , 250 μM , 125 μM , 25 μM y 0 μM (Blanco), las cuales fueron diluidas utilizando *PBS*. La preparación de las muestras fue realizada mezclando una alícuota de 60 μL de *PBS* y 30 μL de muestra. Luego, se sembró las muestras y los estándares en un microplato de 96 pocillos, la siembra de los estándares y las muestras se realizó por triplicado para obtener resultados más exactos, la distribución del microplato se puede observar en la Tabla 1. A continuación el microplato fue llevado a incubación por 30 minutos en agitación constante a 37°C. Al finalizar la incubación, el microplato se leyó en el Espectrofotómetro a 562 nm ⁽⁵²⁾.

Con la data obtenida se hizo una curva de calibración absorbancias vs concentración de las proteínas y se obtuvo la concentración real de las proteínas para posteriores ensayos.

La Tabla 1 contiene la distribución de los estándares para el ensayo *BCA*, cuyas concentraciones fueron 2000 μM , 1500 μM , 1000 μM , 750 μM , 500 μM , 250 μM , 125 μM , 25 μM y 0 μM (Blanco), estos fueron sembrados por triplicado. También, se encuentra la distribución de las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida* a concentraciones 10 μM , 30 μM y 100 μM .

Tabla 1. Distribución de las diluciones en el ensayo BCA.

Fuente: Elaboración propia

	1	2	3	4	5	6
A	Estándar 2000 μM	Estándar 2000 μM	Estándar 2000 μM	100 μM 77	100 μM 77	100 μM 77
B	Estándar 1500 μM	Estándar 1500 μM	Estándar 1500 μM	30 μM 77	30 μM 77	30 μM 77
C	Estándar 1000 μM	Estándar 1000 μM	Estándar 1000 μM	10 μM 77	10 μM 77	10 μM 77
D	Estándar 750 μM	Estándar 750 μM	Estándar 750 μM	100 μM 78	100 μM 78	100 μM 78
E	Estándar 500 μM	Estándar 500 μM	Estándar 500 μM	30 μM 78	30 μM 78	30 μM 78
F	Estándar 250 μM	Estándar 250 μM	Estándar 250 μM	10 μM 78	10 μM 78	10 μM 78
G	Estándar 125 μM	Estándar 125 μM	Estándar 125 μM			
H	Estándar 25 μM	Estándar 25 μM	Estándar 25 μM			
I	Blanco	Blanco	Blanco			

2.2.7. PROTEÍNAS ESPECÍFICAS EN LISADOS CELULARES (WESTERN BLOT)

Con las muestras obtenidas previamente en el lisado celular, se realizó el *western blot*, técnica utilizada para separar e identificar proteínas que se encuentran en una mezcla compleja de proteínas extraídas de las células. ⁽⁵³⁾

Se inició con la electroforesis siguiendo el protocolo proporcionado por el Kit de Electroforesis de la empresa de Bio-Rad, para ello se agregó *loading buffer* a cada muestra basándose en la concentración real de las proteínas previamente encontradas en el ensayo de *BCA*, las muestras utilizadas en este ensayo fueron a concentración 10 μM y 30 μM debido a que la concentración de proteínas encontradas a 100 μM fue muy pequeña. Las suspensiones de las muestras con el *loading buffer* fueron incubadas en un *hotplate* en tubos de microcentrífuga durante 5 minutos a 100°C, luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente mientras se armaba el sistema para la electroforesis. Las muestras y el marcador

molecular fueron cargadas en un gel de agarosa al 10% de la empresa Bio-Rad, una vez cargado el gel se agregó el buffer de corrida y se corrió con una fuente de poder a 120 Voltios por 50 minutos. Terminada la corrida, se dejó enfriando para proceder con la transferencia a la membrana (la membrana utilizada en la transferencia fue de 0.45 μm de PVDF de la empresa Thermofisher). En la Figura 9, se puede observar la distribución utilizada para la siembra de las muestras en el gel.

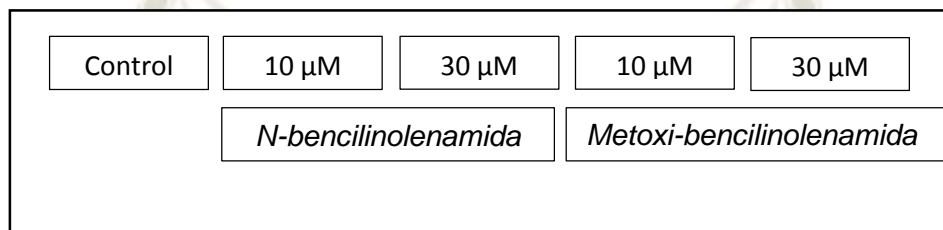


Figura 9. Distribución del gel en el ensayo western blot.

Fuente: Elaboración propia

Una vez terminada la corrida electroforética se procedió a realizar la transferencia de las proteínas a la membrana debido a que lo que se desea es marcar la proteína de interés y el gel no es un soporte adecuado para esto. ⁽⁵⁴⁾ Se procedió al armado del "sándwich", como se observa en la Figura 9, este consta de esponjas, membrana de *PVDF* y gel. Previamente las esponjas y la membrana fueron remojadas en el buffer de transferencia porque se corre el riesgo de que se seque la membrana afectando a la transferencia de las proteínas. Luego del armado del "sándwich", este se colocó en la superficie de transferencia y se expuso a 25 Voltios durante 7 minutos. Transcurrido el tiempo, la membrana fue lavada con buffer de lavado y fue bloqueada utilizando 5% de leche sin grasa (buffer de bloqueo) por una hora a constante agitación en una plataforma de agitación a 4°C. Terminado el bloqueo, se procedió a lavar la membrana con buffer de lavado 3 veces por 5 minutos.

La Figura 10 representa el ensamblado del "sándwich" para la transferencia a la membrana en el ensayo *western blot*. El armado del "sándwich" consiste en la

esponja seguida por el papel filtro, gel, membrana, papel filtro y esponja, de polo negativo a polo positivo respectivamente.



Figura 10. Ensamblado del "sándwich" Obtenido del protocolo de la empresa ABcam⁽⁵⁵⁾.

2.2.8. DETERMINACIÓN DE LOS BIOMARCADORES (p53, PARP-1, LRP1 Y Bcl-2)

Con la membrana previamente lavada, se procedió a incubar con el anticuerpo primario. En todos los casos se utilizó el anticuerpo primario Anti-Rabbitt (ab97051). Todos los anticuerpos fueron diluidos 1/5000 con buffer de bloqueo.

Cada membrana fue incubada con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C en constante agitación en la plataforma de agitación, de esa manera aseguramos que el anticuerpo primario se una a la proteína. Pasado el tiempo de incubación se procedió a lavar tres veces la membrana con buffer de lavado por 5 minutos cada uno. Seguidamente se procedió a incubar con el anticuerpo secundario PARP-1 (ab32064) en una dilución de 1/5000, LRP1 (ab92544) en una dilución de 1/10000, Bcl-2 (ab59348) en una dilución de 1/1000 y p53 (ab179477) en una dilución de 1/2000 con buffer de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se volvió a lavar la membrana tres veces con buffer de lavado por 5 minutos cada uno.

2.2.9. DETECCIÓN Y REVELADO DE PROTEÍNAS

Se hizo el revelado utilizando dos reactivos: *Super Signal West Pico Plus Stable Peroxide Solution* (sustrato diseñado para proporcionar una excelente intensidad de señal y sensibilidad para la transferencia Western con conjugados de peroxidasa de rábano picante HRP) y *Super Signal West Pico Plus Luminol/Enhancer Solution* (quimioluminiscente mejorado, sensible a base de luminol) de la empresa Thermofisher. Ambos sustratos se mezclaron colocando 2.5 mL de cada uno, se dejó incubar por 5 minutos en constante agitación en la plataforma de agitación a temperatura ambiente y se lavó con buffer de lavado por 3 veces durante 5 minutos, después se retiró la membrana del buffer de lavado y se colocó en el escáner. La membrana fue escaneada utilizando *C-DiGit Blot Scanner (Li-Cor)*, las imágenes se observaron y analizaron en *ImageStudio*.

2.2.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CASPASA 3

La determinación de este ensayo se realizó para saber si la caspasa 3 estaba presente en las líneas celulares, ya que esta caspasa está presente en la cascada apoptótica. En este ensayo se utilizó el Kit de caspasa 3 de la empresa BioVision y el protocolo seguido fue proporcionado por la misma empresa ⁽⁵⁶⁾.

Para este ensayo, se sembró células en un frasco de cultivo de 3 mL con medio completo *DMEM* y fueron incubadas durante 4 días. Pasados los 4 días, se descartó el medio, se agregó el PBS y se raspo las células con *cells scraper*. Las células obtenidas fueron transferidas a un tubo nuevo el cual fue centrifugado a 500 rpm por 3 minutos, luego de la centrifugación, el sobrenadante fue eliminado y se procedió a resuspender el pellet con 50 μ L de buffer de lisis celular. A continuación, se realizó una incubación en hielo durante 30 minutos y se volvió a centrifugar por un minuto a 10000 rpm. El sobrenadante obtenido fue transferido a tubos de microcentrífuga y se realizó el ensayo de *BCA* para conseguir la concentración real de proteínas.

Una vez conocida la concentración real de las proteínas, se añadió 50 μL de 2x *Reaction Buffer* y 5 μL de sustrato *DEVD-Pna* (4mM), la mezcla fue incubada a 37°C por una hora. Finalizada la incubación, se procedió a analizar a $\lambda=405$ nm en el espectrofotómetro. La distribución utilizada para la siembra de muestras, se observa en la Tabla 2, en donde se utilizó *Stausporine* como control positivo, la cual fue sembrada por duplicado.

La Tabla 2 contiene la distribución para el ensayo de caspasa. Las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida* se encuentran a 10 μM y 30 μM .

Tabla 2. Distribución de las muestras en el microplato de 96 pocillos para el ensayo de caspasas 3.

Fuente: Elaboración propia

	1	2	3
A	<i>Stausporine</i>	30 μM Metoxi-bencilinolenamida	30 μM N-bencilinolenamida
B	<i>Stausporine</i>	10 μM Metoxi-bencilinolenamida	10 μM N-bencilinolenamida

2.2.11. DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (EROS)

Este ensayo se realizó basándose en el protocolo proporcionado por el Kit EROS de la empresa Thermofisher ⁽⁵⁷⁾, el cual fue optimizado para la línea celular *SH-SY5Y*.

Esta prueba utiliza al reactivo CM-H₂DCFDA que es un derivado clorometílico de *H₂DCFDA*, usado como indicador de especies reactivas de oxígeno (EROS) en las células. Este se difunde pasivamente en las células, donde sus grupos acetato se dividen por esterasas intracelulares y su grupo clorometilo reactivo con tiol reacciona con el glutatión intracelular y otros tioles. La oxidación posterior produce un aducto fluorescente que queda atrapado dentro de la célula. ⁽⁵⁷⁾

Este ensayo se inició con el sembrado de 50 mil células en un microplato poli-D-lisina de 96 pozos, se utilizó este microplato debido a que contiene un aminoácido que se encarga de mantener las células adheridas a la superficie ya que el reactivo de este Kit provoca la desadherencia, y se dejó incubando durante toda la noche con el medio completo *DMEM*. El kit contenía un vial con el reactivo mencionado anteriormente que fue diluido con *DMSO*, se colocó 50 μL de vial para 100 μL de *DMSO*.

Luego se procedió a preparar la tinción en *FSM-DMEM* añadiendo 100 μL de la dilución previamente descrita con 4.3 mL del medio *Phenol Free DMEM* y se reservó. Se utilizó el medio *Phenol Free DMEM* porque al no poseer color alguno no interfiere en ninguno de los estudios posteriores; esta dilución se utilizó para 40 pozos.

Terminada la incubación de los microplatos, se eliminó el medio completo *DMEM* y se lavó dos veces con *Phenol Free DMEM*, a continuación, se agregó 100 μL por pozo de la dilución previamente preparada y se dejó en la incubadora de crecimiento celular a 37°C con 5% CO_2 durante 30 minutos en total oscuridad para que el reactivo de tinción no se degrade al contacto con la luz.

Finalizada la incubación, se eliminó el sobrenadante y se volvió a incubar con medio *Phenol Free DMEM* durante una hora. Concluida la incubación, se retiró el medio *Phenol Free DMEM* y se agregaron los tratamientos, los cuales fueron preparados con el medio *Phenol Free DMEM* y las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida* a concentraciones 10 μM , 30 μM y 100 μM . La distribución de los tratamientos se muestra en la Tabla 3. Finalmente, se incubó durante 2, 4 y 5 horas. Los microplatos fueron llevados al espectrofotómetro y se hizo la lectura a las absorbancias a 2, 4 y 5 horas a 492-495 nm ⁽⁵⁷⁾.

La Tabla 3 contiene la distribución en un microplato de 96 pocillos para el ensayo de EROS. Se encuentran distribuidos los tratamientos con las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida* a concentraciones 10 μM , 30 μM y 100 μM , también se encuentra un control con células y medio, otro control con medio sin células y un control el cual tenía células y medio mas no se le aplicó el reactivo *DCFDA*. Este ensayo fue realizado con seis repeticiones,

debido a los problemas que se presentaron al realizar un ensayo con el protocolo sin optimización brinda por la empresa Thermofisher.

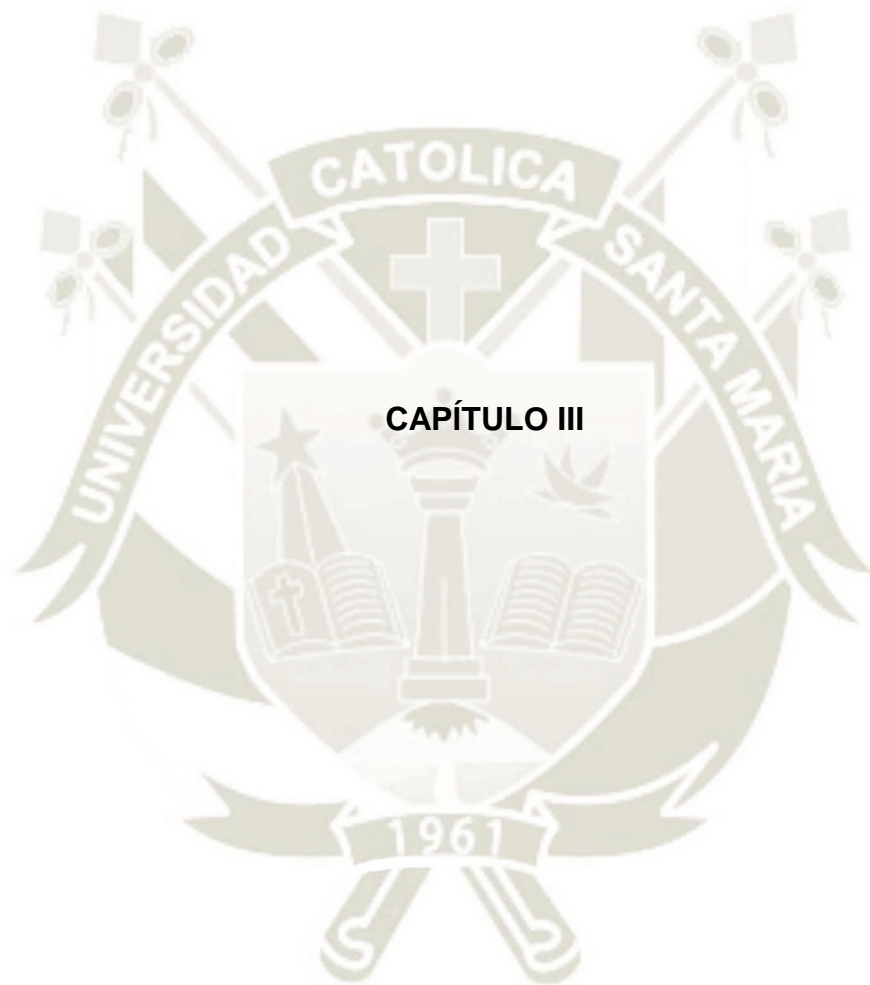
Tabla 3. Diseño para la siembra de los tratamientos en el ensayo de EROS.

Fuente: Elaboración propia

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	N-bencilinolenamida			Metoxi-bencilinolenamida			H2O2				
A	Control	10 μ M	30 μ M	100 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M	1000 μ M	sin DCFDA	Blanco sin células
B	Control	10 μ M	30 μ M	100 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M	1000 μ M	sin DCFDA	Blanco sin células
C	Control	10 μ M	30 μ M	100 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M	1000 μ M	sin DCFDA	Blanco sin células
D	Control	10 μ M	30 μ M	100 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M	1000 μ M	sin DCFDA	Blanco sin células
E	Control	10 μ M	30 μ M	100 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M	1000 μ M	sin DCFDA	Blanco sin células
F	Control	10 μ M	30 μ M	100 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M	1000 μ M	sin DCFDA	Blanco sin células

2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los ensayos de determinación de especies reactivas de oxígeno (EROS), de concentración y viabilidad celular (MTS) utilizó el test de *one-way Anova*. Las múltiples comparaciones entre las dos macamidas sintéticas, blancos y controles se determinaron mediante el test de *post hoc Tuckey*. El software estadístico utilizado fue *GraphPad Prism 6*.



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR Y DETERMINACIÓN DE IC_{50}

Para la determinación de la viabilidad celular se utilizó el pasaje 6 porque se observó que en este pasaje las células estaban completamente desarrolladas. La viabilidad se determinó mediante la técnica de azul de tripán, este colorante es utilizado debido a que no puede ingresar ni teñir a células que se encuentran integras. ⁽²⁰⁾ Se siguió el protocolo previamente descrito en el Capítulo 2. El porcentaje de viabilidad celular encontrado fue de 95.8 % lo cual según referencia ⁽⁵⁸⁾ está entre los rangos aceptables para realizar los ensayos posteriores.

El ensayo de MTS fue utilizado para encontrar la IC_{50} . Este ensayo colorimétrico sirve para la cuantificación de células viables basándose en la reducción del compuesto de tetrazolio (MTS) por células viables, las cuales generan un producto coloreado (formazán) soluble en medios de cultivo celular. ⁽⁵⁹⁾

3.1.1. RESULTADOS DE IC_{50} OBTENIDOS AL APLICAR EL TRATAMIENTO CON MACAMIDA SINTÉTICA *N-BENCILINOLENAMIDA* EN LÍNEAS CELULARES SH-SY5Y

Para la determinación de la viabilidad con el ensayo de MTS en las líneas celulares tratadas con la macamida sintética *N-bencilinolenamida* se utilizó las siguientes concentraciones 0 μ M, 0.1 μ M, 0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M y 100 μ M, las cuales fueron preparadas usando el medio bajo en suero. Se sembró 500 mil células/pozo en un microplato de 96 pozos y se dejó incubando durante 24 horas con medio completo a 37°C. El medio completo fue retirado y se aplicó el tratamiento a las concentraciones previamente descritas en medio bajo en suero durante 24 horas. Luego de las 24 horas, se aplicó el reactivo MTS con un

medio bajo en suero como se describió previamente en el Capítulo 2 y se obtuvo los resultados mostrados en el Anexo 2, con los cuales se obtuvo el Figura 10.

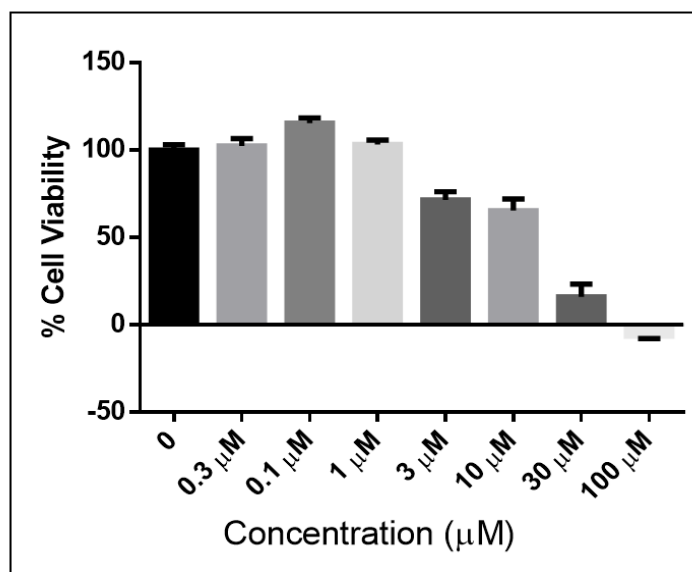


Figura 11. Porcentaje de viabilidad celular vs Concentración μM de la macamida sintética *N*-bencilinolenamida ($0 \mu\text{M}$ a $100 \mu\text{M}$).

La Figura 11 representa el porcentaje de viabilidad celular obtenido a partir de la exposición de la línea celular de neuroblastoma frente al tratamiento con la macamida sintética *N*-bencilinolenamida a diferentes concentraciones $0 \mu\text{M}$, $0.1 \mu\text{M}$, $0.3 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$.

En la Figura 11, se puede observar que de $0 \mu\text{M}$ a $1 \mu\text{M}$ el porcentaje de viabilidad celular es constante, ya que el porcentaje de viabilidad es cercano a 100%. De $3 \mu\text{M}$ a $10 \mu\text{M}$ se puede observar un cambio en la viabilidad ya que bajó a 70%. Sin embargo, en la concentración $30 \mu\text{M}$ se observa que la viabilidad disminuyó significativamente a un 20% por lo que podemos afirmar que a esta concentración existen mayor citotoxicidad. En la concentración $100 \mu\text{M}$ las células se encontraban totalmente muertas.

Luego del ensayo MTS, se puede observar que existe un viraje de color que varía entre rojo grosella y marrón, como se muestra en la Figura 11. Esto se debe a la formación del formazán, el cual es el indicador de la existencia de células viables.

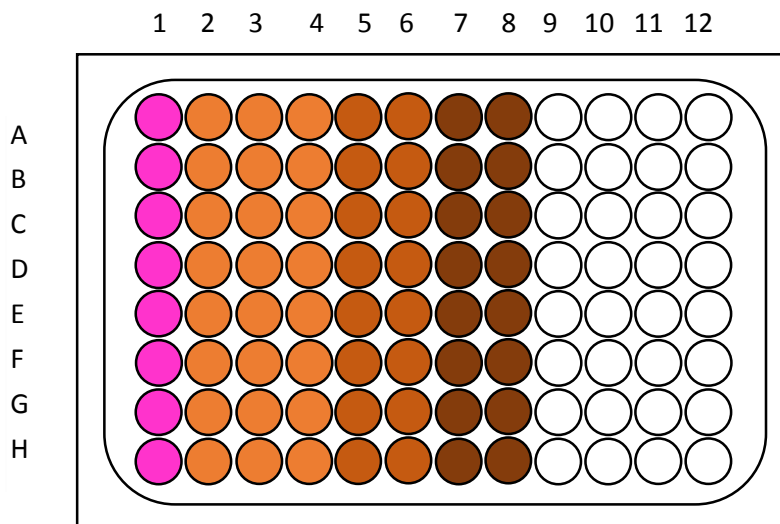


Figura 12. Microplato post MTS para la macamida sintética *N-bencilinolenamida*. 1) Control, 2) 0.1 μM , 3) 0.3 μM , 4) 1 μM , 5) 3 μM , 6) 10 μM , 7) 30 μM y 8) 100 μM .

Fuente: Elaboración propia

La Figura 12 representa los resultados del ensayo de MTS en un microplato de 96 pocillos. En la columna 1 se encuentra el control el cual tenía las células sin tratamiento y medio bajo en suero. Las columnas 2-8 tenían células con el tratamiento respectivo, a los cuales se les aplicó el reactivo de MTS.

En la Figura 12, se observa que en el control no hubo viraje de color debido a que conservo el color del medio (rojo grosella) porque todas células se encontraban viables, en las columnas 2, 3, 4 si hubo cambio de color (anaranjado) debido a que la cantidad células viables era menor, en las columnas 5 y 6 hubo mayor cambio de color (canela) y en las columnas 7 y 8 el viraje fue total (marrón) debido a la cantidad de células viables fue casi nulo.

Con los datos obtenidos del anexo 2 se calculó el IC_{50} .

La Figura 13 representa la curva que se obtuvo al encontrar la IC_{50} de la macamida sintética *N-bencilinolenamida* obtenida a partir de relacionar el porcentaje de viabilidad celular con el logaritmo de las concentraciones del tratamiento.

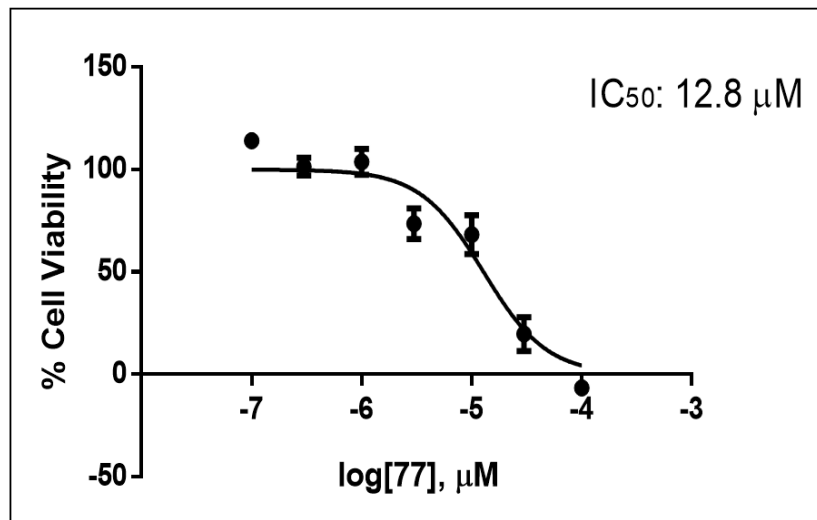


Figura 13. Porcentaje de viabilidad celular y obtención de IC₅₀ de la macamida sintética *N*-bencilinolenamida.

En la Figura 13, se puede observar que la IC₅₀ encontrada con el software *GraphPad Prism 6* para la macamida sintética *N*-bencilinolenamida fue 12.8 µM. Es decir que 12.8 µM fue la concentración necesaria para obtener el 50% de células muertas.

3.1.2. RESULTADOS DE IC₅₀ OBTENIDOS AL APLICAR EL TRATAMIENTO CON MACAMIDA SINTÉTICA METOXI-BENCILINOLENAMIDA EN LÍNEAS CELULARES SH-SY5Y

Para la determinación de la viabilidad con el ensayo de MTS en las líneas celulares tratadas con la macamida sintética *Metoxi-bencilinolenamida* se utilizó las siguientes concentraciones: 0 µM, 0.1 µM, 0.3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM y 100 µM. Se sembró 500 mil células/pozo en un plato de 96 pozos y se dejó incubando durante 24 horas con medio completo a 37°C. El medio completo fue retirado y se aplicó el tratamiento a las concentraciones previamente descritas durante 24 horas. Luego fue aplicado el MTS dejando en reposo por 3 horas y fue leído a 490nm. Los valores obtenidos se encuentran en el Anexo 3 y con el promedio de los mismos se obtuvo la Figura 14.

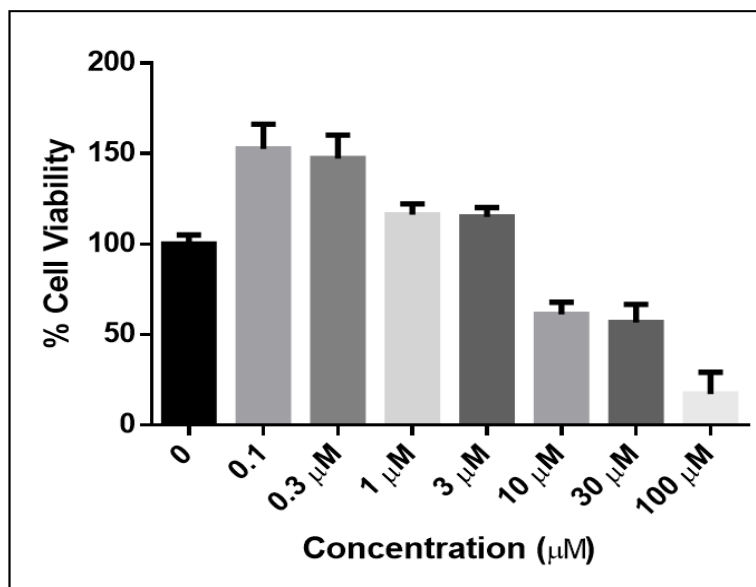


Figura 14. Porcentaje de viabilidad celular vs Concentración μM de la macamida sintética *Metoxi-bencilinolenamida* ($0 \mu\text{M}$ a $100 \mu\text{M}$).

La Figura 14 representa el porcentaje de viabilidad celular obtenido a partir de la exposición de la línea celular de neuroblastoma frente al tratamiento con la macamida sintética *Metoxi-bencilinolenamida* a diferentes concentraciones $0 \mu\text{M}$, $0.1 \mu\text{M}$, $0.3 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$.

En la Figura 14, se puede observar que de $0.1 \mu\text{M}$ a $0.3 \mu\text{M}$ el porcentaje de viabilidad celular se incrementa al 150%, esto quiere decir que se promueve el crecimiento celular, por lo que se presume que a estas concentraciones tendría un efecto neuroprotector. En las concentraciones $1 \mu\text{M}$ a $3 \mu\text{M}$ se observa que el porcentaje de viabilidad es constante, ya que es cercano a 100%. El cambio se encontró en las concentraciones $10 \mu\text{M}$ y $30 \mu\text{M}$ en las que se observa que la viabilidad disminuyó significativamente a un 70%. Sin embargo, en la concentración $100 \mu\text{M}$ se observó disminución a 20% de viabilidad celular, por lo que podemos afirmar que a esta concentración existen mayor citotoxicidad.

Luego del ensayo MTS, se puede observar que existe un viraje de color que varía entre rojo grosella y marrón, como se muestra en la Figura 14. Esto se debe a la formación del formazán, el cual es el indicador de la existencia de células viables.

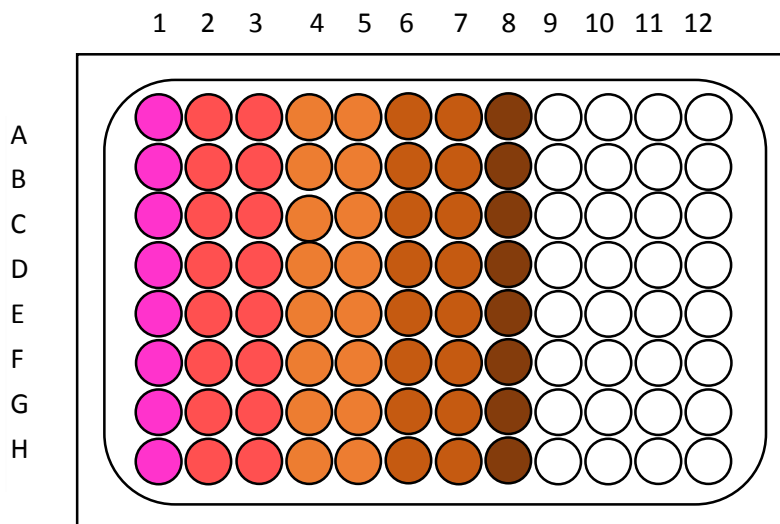


Figura 15. Microplato post MTS para con la macamida sintética Metoxibencilinolenamida. 1) Control, 2) 0.1 μ M, 3) 0.3 μ M, 4) 1 μ M, 5) 3 μ M, 6) 10 μ M, 7) 30 μ M y 8) 100 μ M.

Fuente: Elaboración propia

La Figura 15 representa los resultados del ensayo de MTS en un microplato de 96 pocillos. En la columna 1 se encuentra el control el cual tenía las células sin tratamiento y medio bajo en suero. Las columnas 2-8 tenían células con el tratamiento respectivo, a los cuales se les aplicó el reactivo de MTS.

En la Figura 15, se observa que en el control no hubo viraje de color debido a que conservo el color del medio (rojo grosella) porque todas células se encontraban viables, en las columnas 2, 3 hubo cambio de color (salmón), dicho cambio se dio debido al color del reactivo MTS mezclado con el medio ya que como se observó en la Figura 13 hubo un incremento en la viabilidad celular, en las columnas 4 y 5 si hubo el cambio de color (anaranjado) debido a que la cantidad células viables era menor, en las columnas 6 y 7 hubo un mayor cambio de color (canela) y en la columna 8 el viraje fue total (marrón) debido a la cantidad de células viables fue casi nulo.

Con los datos obtenidos en el Anexo 3 se calculó el IC₅₀.

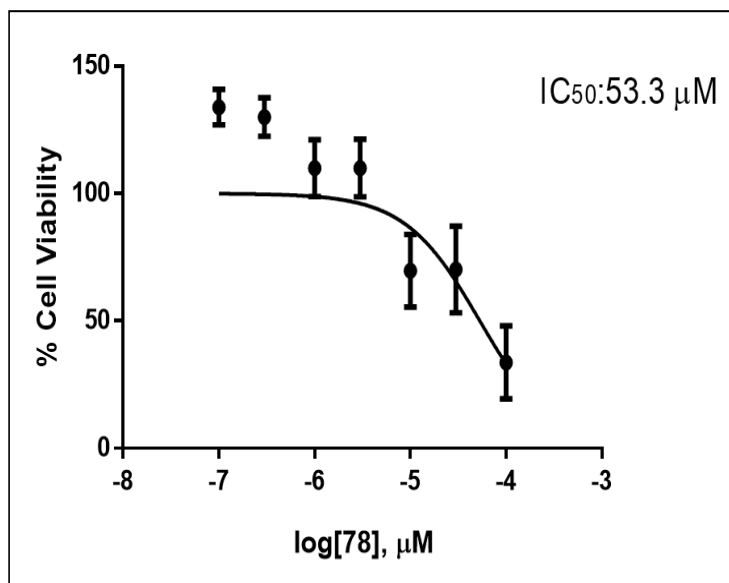


Figura 16. Porcentaje de viabilidad celular y obtención de la IC_{50} macamida sintética *Metoxi-bencilinolenamida*.

La Figura 16 representa la IC_{50} de la macamida sintética *Metoxi-bencilinolenamida* obtenida a partir de la relación del porcentaje de viabilidad celular y el logaritmo de las concentraciones del tratamiento.

Como se puede observar en la Figura 16, se puede observar que la IC_{50} encontrado con el software *GraphPad Prism 6* para la macamida sintética *Metoxi-bencilinolenamida* fue $53.3 \mu\text{M}$. Es decir que $53.3 \mu\text{M}$ fue la cantidad necesaria para obtener el 50% de células muertas. En otro estudio se encontró una IC_{50} de $47.26 \mu\text{M}$ para el extracto de *C. bulbispermum* (planta herbácea) en la misma línea celular lo que quiere decir que la macamida sintética *Metoxi-bencilinolenamida* es menos tóxica ⁽⁶⁰⁾.

Después de observar los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular, observamos que la macamida sintética *N-bencilinolenamida* necesitó de la concentración $30 \mu\text{M}$ para causar citotoxicidad a diferencia de la macamida sintética *Metoxi-bencilinolenamida* la cual necesitó una concentración de $100 \mu\text{M}$. Además, se observó que la macamida sintética *Metoxi-bencilinolenamida* provocó un incremento en la viabilidad celular a concentraciones de $0.3 \mu\text{M}$ y $0.1 \mu\text{M}$, efecto que no se observa la macamida sintética *N-bencilinolenamida*, lo cual

podría ser efecto del grupo metoxi en la estructura de la macamida sintética *Metoxi-bencilinolenamida*.

El grupo metoxi es donador de electrones, por lo que neutraliza los efectos tóxicos de EROS ⁽⁶¹⁾, esta sería la razón de la posible neuroprotección evidenciada en los resultados obtenidos en la IC₅₀ de la macamida sintética *Metoxi-bencilinolenamida*.

3.4. PROTEÍNAS TOTALES (LISADO CELULAR)

Para realizar la técnica de *western blot*, se necesita conocer la concentración de proteínas totales en las muestras tratadas por lo que se realizó la respectiva curva de calibración para cada uno de los ensayos.

3.4.1 CURVA DE CALIBRACIÓN DE CASPASAS

Los valores necesarios para obtener la curva de calibración se encuentran en la Tabla 4, donde se muestra la cantidad de proteínas totales para el ensayo de caspasas, la concentración real de las proteínas fue hallada con el ensayo *BCA*. Para este ensayo se necesitó mayor concentración de proteínas a diferencia de otros ensayos, por lo que se realizó una curva de calibración específica.

El ensayo de las caspasas es colorimétrico y la detección espectrofotométrica del cromóforo p-nitroanilina (pNA) se dá después de la escisión del sustrato marcado DEVD-pNA ⁽⁵⁶⁾. Se utilizó como control positivo a la *Stausporine* porque este compuesto produce la activación de la caspasa 3 en esta línea celular. Las concentraciones usadas fueron 10 μ M y 30 μ M para las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida*.

La Tabla 4 contiene 5 columnas, en la primera se encuentran el control positivo (*Stausporine*) y los tratamientos aplicados para las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida*. La segunda columna contiene la concentración a la que se encontraban las proteínas, en la tercera se encuentran

las concentraciones reales de las proteínas las cuales se hallaron multiplicando la concentración por 3 debido a que los ensayos se realizaron por triplicado. En la cuarta se encuentran las desviaciones estándar y en la quinta el porcentaje de coeficiente de variación.

Tabla 4. Valores obtenidos de las concentraciones reales para el ensayo de caspasas.

	CC	CC REAL	SD	%CV
STAUSPORINE	417.593	1252.778	0.904	0.072
10 μ M 77	1555	4665	0.021	0.000
30 μ M 77	1590.185	4770.556	0.006	0.000
10 μ M 78	1840.556	5521.667	0.060	0.001
30 μ M 78	1987.963	5963.889	0.013	0.000

Los valores obtenidos de la lectura de las absorbancias de los estándares en el espectrofotómetro se observan en la Tabla 5.

Tabla 5. Absorbancias de los estándares.

	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Promedio ABS	SD, ABS
2000 μ M	1.491	1.504	1.525	1.506	0.017
1000 μ M	0.829	0.866	0.900	0.865	0.036
500 μ M	0.448	0.456	0.493	0.465	0.024
250 μ M	0.218	0.224	0.259	0.233	0.022
125 μ M	0.099	0.103	0.137	0.113	0.021

La Tabla 5 contiene 6 columnas. En la primera se encuentran los estándares utilizados para el ensayo de *BCA*. Las columnas 2, 3 y 4 contienen las absorbancias obtenidas de los estándares. La quinta columna contiene el promedio de las absorbancias de las columnas 2, 3 y 4. La sexta columna contiene las desviaciones estándar de las absorbancias.

En la Figura 17, se observa la curva de calibración que fue obtenida a partir de relacionar las absorbancias de los estándares vs la concentración de los estándares del ensayo de *BCA*. El coeficiente de correlación es 0.9935, que es cercano a 1 por lo que es aceptable para seguir con los siguientes ensayos.

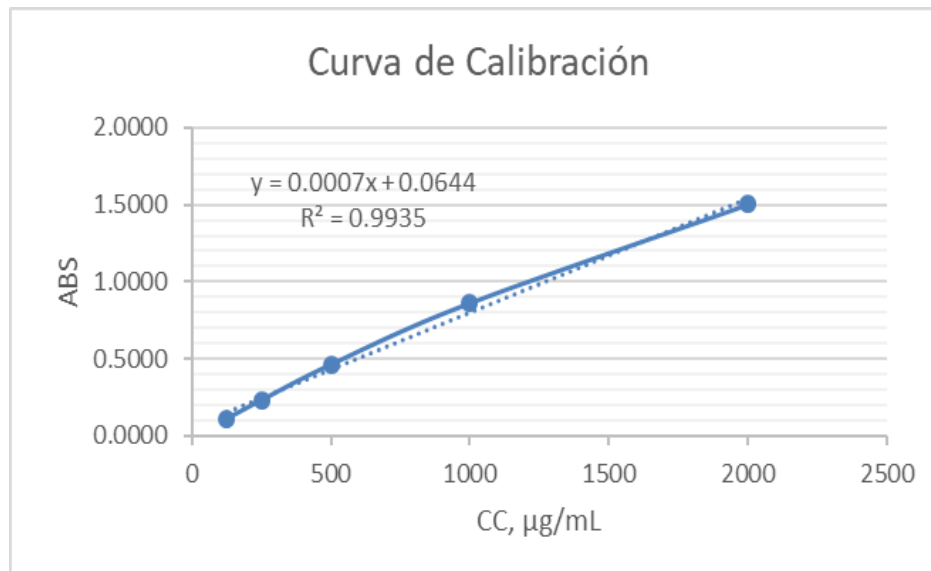


Figura 17. Curva de calibración obtenida de las absorbancias vs la concentración de proteínas ($\mu\text{g/mL}$).

3.4.2 CURVA DE CALIBRACIÓN

La determinación de la concentración de las proteínas presentes en las muestras con *BCA* se realizó para el ensayo de *western blot*. Los valores necesarios para obtener la curva de calibración se encuentran en la Tabla 6, donde se puede observar la cantidad de proteínas totales para el ensayo de *western blot*. La curva de calibración que se observa en la Figura 17 fue usada para posteriores ensayos, a diferencia del ensayo de caspasas en el cual se utilizó una curva de calibración específica.

La Tabla 6 contiene siete columnas. En la primera se encuentran el control positivo (*Stausporine*) y los tratamientos aplicados de las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida*. La segunda columna contiene

la concentración a la que se encontraban las proteínas, en la tercera se encuentran las concentraciones reales de las proteínas las cuales se hallaron multiplicando la concentración por 3 debido a que los ensayos se realizaron por triplicado. En la cuarta se encuentran las desviaciones estándar. La quinta contiene los porcentajes de coeficiente de variación. En la sexta se encuentran las unidades de proteínas por mL y en la séptima se encuentra la cantidad de *loading buffer* en μL .

Tabla 6. Valores obtenidos de las concentraciones para el ensayo de Western Blot.

	CC	CC REAL	SD	%CV	20 U / mL *	Loading Buffer μL
STAUSPORINE	382.037	1146.111	4.04E-03	3.53E-04	17.45	5.817
10 μM 77	389.074	1167.222	2.65E-03	2.27E-04	17.135	5.712
30 μM 77	465.741	1397.222	8.66 E-03	6.20E-04	14.314	4.771
10 μM 78	412.037	1236.111	8.50E-03	6.88E-04	16.18	5.393
30 μM 78	389.444	1168.333	4.51E-03	3.86E-04	17.118	5.706

* $20 \text{ U / mL} = (20 / \text{CC REAL}) \times 1000$, esta fórmula significa que para realizar el Western Blot debe haber 20 unidades de proteína por mL.

Los valores obtenidos de la lectura de las absorbancias de los estándares en el espectrofotómetro se observan en la Tabla 7. Esta contiene seis columnas. En la primera se encuentran los estándares utilizados para el ensayo de *BCA*. Las columnas 2, 3 y 4 contienen las absorbancias obtenidas de los estándares. La quinta columna contiene el promedio de las absorbancias de las columnas 2, 3 y 4. La sexta columna contiene las desviaciones estándar de las absorbancias.

Tabla 7. Las absorbancias de los estándares.

	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Promedio ABS	SD, ABS
2000 μM	1.491	1.504	1.525	1.506	0.017
1000 μM	0.829	0.866	0.900	0.865	0.036
500 μM	0.448	0.456	0.493	0.465	0.024
250 μM	0.218	0.224	0.259	0.233	0.022
125 μM	0.099	0.103	0.137	0.113	0.021

En la Figura 18, se observa que el coeficiente de correlación es 0.9909, que es cercano a 1 por lo que es aceptable para seguir con los siguientes ensayos

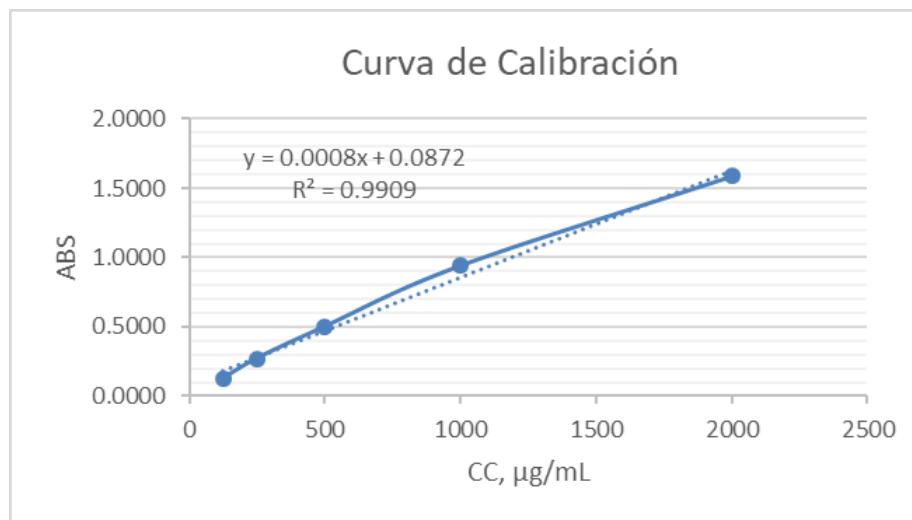


Figura 18. Curva de calibración obtenida de las absorbancias vs la concentración de proteínas ($\mu\text{g/mL}$).

3.5. HIDRÓLISIS DE PARP-1 EN CÉLULAS SH-SY5Y (WESTERN BLOT)

Utilizando la curva de calibración de la Figura 17, se realizó el ensayo de *western blot* para el biomarcador PARP-1.

3.5.1. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA PARP- 1 EN LÍNEAS CELULARES SHSY5Y TRATADAS CON LAS MACAMIDAS SINTÉTICAS N-BENCILINOLENAMIDA Y METOXI-BENCILINOLENAMIDA.

PARP-1 es una proteína nuclear abundante que desempeña un papel central en la homeostasis celular. Participa en diversas funciones fisiológicas y patológicas como muerte celular. Tiene fragmentos que son biomarcadores reconocidos para patrones específicos de actividad de proteasa en muerte celular. ⁽⁶²⁾ El

incremento de la presencia proteínica fue determinada para saber si la muerte celular sigue el mecanismo de apoptosis.

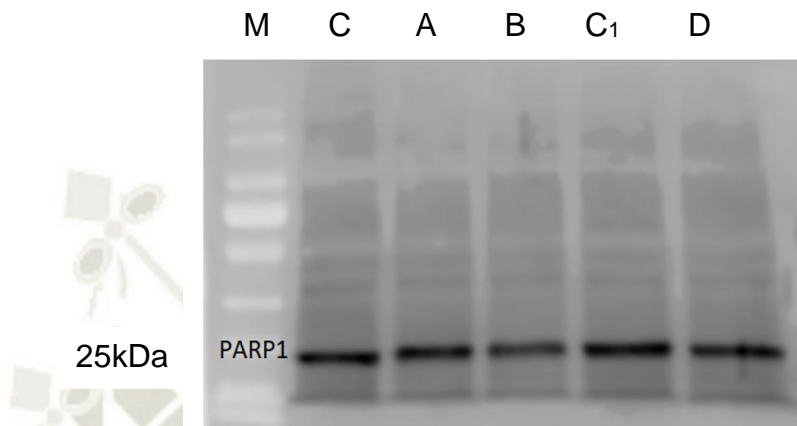


Figura 19. Bandas obtenidas a partir del Western blot para PARP - 1. Donde M es el marcador molecular, C es control, A es macamida sintética N-bencilinolenamida (10 μ M), B es macamida sintética N-bencilinolenamida (30 μ M), C1 es macamida sintética Metoxi-bencilinolenamida (10 μ M) y D es macamida sintética Metoxi-bencilinolenamida (30 μ M)

* En esta membrana no hubo la presencia de la β -actina debido a que fue reutilizada aplicando la técnica del *stripping*.

La técnica del *stripping* se aplica utilizando el reactivo de Thermo Scientific *Restore Western Blot Stripping Buffer*, la cual posee una formulación robusta pero suave para eliminar los anticuerpos primarios y secundarios de las transferencias para permitir varias repeticiones en la misma membrana. ⁽⁶³⁾

Como se mencionó anteriormente, sólo se utilizó concentraciones 10 μ M y 30 μ M para ambas macamidas sintéticas debió a que a concentración 100 μ M no se obtuvo la cantidad necesaria de proteínas.

En la Figura 19, se utilizó un marcador molecular de peso 10-180 kDa (ab116027), además, se muestra una banda a 25 kDa la cual pertenece al peso

molecular de PARP-1. Como se puede observar esta proteína está expresada en todos los ensayos incluyendo al Control que solo fue expuesto a *DMEM* bajo en suero debido a que esta proteína está involucrada en la homeostasis. En el ensayo b se observa que la banda es más clara lo que se puede deber a la disminución de esta proteína debido a que la macamida sintética *N-bencilinolenamida* produce mayor citotoxicidad haciendo que PARP-1 sea inhibida ⁽⁴⁵⁾.

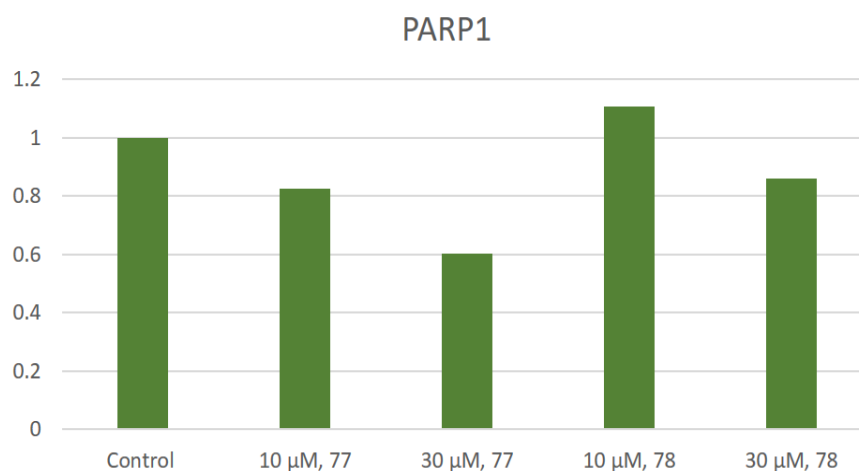


Figura 20. Efecto de las macamidas sintéticas N-bencilinolenamida y Metoxi-bencilinolenamida a concentración (10 μM y 30 μM) sobre la hidrólisis de PARP-1 en células SH-SY5Y a través del método western blot.

La Figura 20 representa la cantidad del biomarcador PARP-1 presente en el control y en las diferentes concentraciones de los tratamientos de las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida*.

En la Figura 20, se puede observar que hubo un incremento de PARP-1 para la concentración 10 μM de la macamida sintética *Metoxi-bencilinolenamida*. Sin embargo, en los demás casos no hubo ningún incremento, es decir, que la macamida sintética *Metoxi-bencilinolenamida* a concentración 10 μM produce protección a nivel celular y mantiene la integridad del genoma. En otro estudio se encontró que la droga Talipexole 1mM, la cual es usada para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, también produce un incremento de PARP-1 debido a que esta causa la neuroprotección de las células sin daño ⁽⁶⁴⁾.

3.6. DETERMINACIÓN DE LRP1

De la misma manera la Figura 17 fue el punto de partida para realizar el ensayo de *western blot* para el biomarcador LRP1.

3.6.1. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA LRP-1 EN LÍNEAS CELULARES SH-SY5Y TRATADAS CON MACAMIDAS SINTÉTICAS N-BENCILINOLENAMIDA Y METOXI-BENCILINOLENAMIDA

LRP1 es un receptor de superficie celular multifuncional que se expresa altamente en las neuronas, tiene un peso molecular de 38 kDa. La falta de LRP1 en las neuronas diferenciadas desarrolla anomalías conductuales y motoras severas. Se evaluó este biomarcador para saber si estas macamidas sintéticas producían algún tipo de anomalías o enfermedades neuronales. ⁽⁴¹⁾

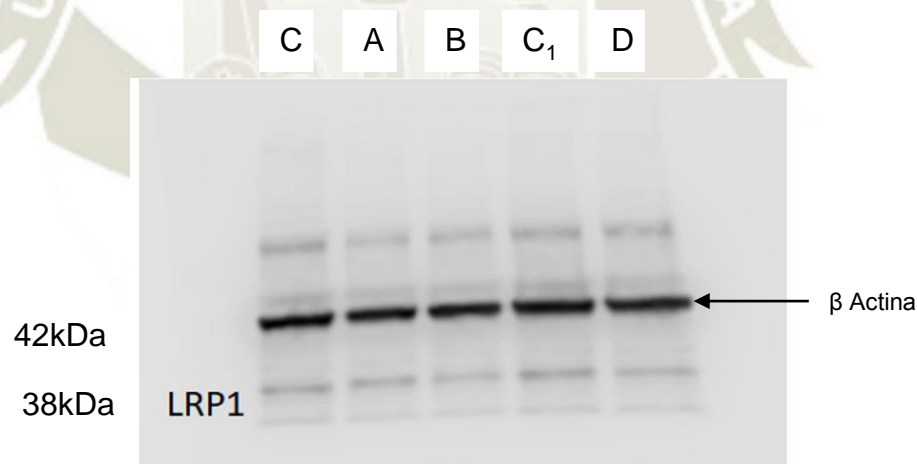


Figura 21. Bandas obtenidas a partir del Western blot para LRP-1. Donde C es control, A es macamida sintética N-becilinolenamida (10 μ M), B es macamida sintética N-becilinolenamida (30 μ M), C₁ es macamida sintética Metoxi-becilinolenamida (10 μ M) y D es macamida sintética Metoxi-becilinolenamida (30 μ M)

Como se sabe el biomarcador LRP1 está siempre presente en las células neuronales, por lo que está presente hasta en el control, como se puede observar

en la Figura 21. La reducción de LRP1 está asociada con trastornos neurológicos (65). Las bandas que aparecen en la macamidas sintética *N-bencilinolenamida* (10-30 μM) y *Metoxi-bencilinolenamida* (30 μM) son más claras, afirmando que a estas concentraciones dichas macamidas presentan algún efecto en la expresión de esta proteína relacionándola de esta manera a la citotoxicidad.

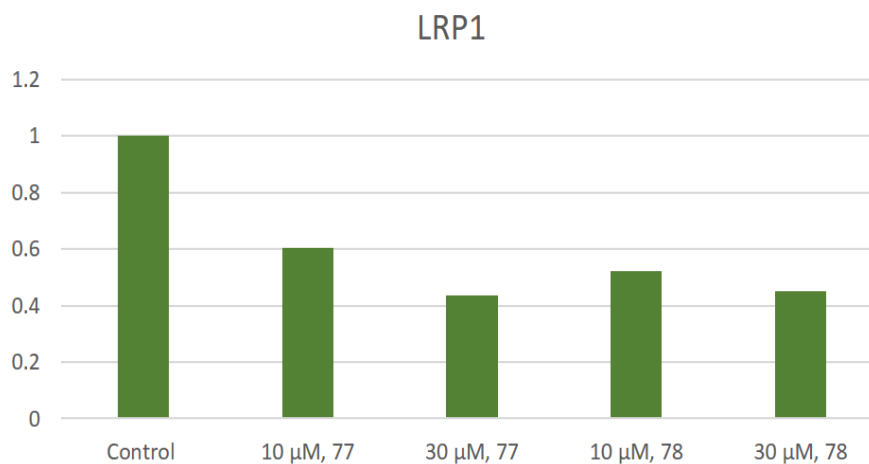


Figura 22. Efecto de las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida* a concentración 10 μM y 30 μM sobre LRP1 en líneas celulares SH-SY5Y.

La Figura 22 representa la cantidad del biomarcador LRP1 presente en el control y en las concentraciones 10 μM y 30 μM de los tratamientos con las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida*.

En la Figura 21, el marcador utilizado fue de un peso molecular 10-180 kDa (ab116027), además se puede observar que, de acuerdo al control, hubo una disminución de LRP1 en las células tratadas con las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida* (10-30 μM), esto quiere decir que podría existir anomalías o enfermedades neuronales producidas por estas macamidas sintéticas. En otro estudio se encontró que de manera contraria al efecto de las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida*, el extracto del arroz integral germinado (GBR) produjo un aumento de LRP1 causando la regulación del amiloide $\text{A}\beta$, el cual como ya se sabe cuándo se acumula por su sobreexpresión causa un desbalance a nivel

cerebral ocasionando enfermedades neurodegenerativas ⁽⁶⁶⁾, por lo que se diría que el GBR causa la neuroprotección ⁽⁶⁷⁾.

3.7. DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA p53

De la misma manera la Figura 17 fue el punto de partida para el ensayo de *western blot* para el biomarcador p53.

3.7.1. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA p53 EN LÍNEAS CELULARES SH-SY5Y TRATADAS CON MACAMIDAS SINTÉTICAS N-BENCILINOLENAMIDA Y METOXI-BENCILINOLENAMIDA

La proteína p53 normalmente está 'desactivada', se activa solo cuando las células están estresadas o dañadas. p53 detiene la multiplicación de células dañadas o incluso causa la muerte celular, por lo tanto, esta proteína proporciona un freno crítico al desarrollo tumoral, pero si se encuentra sobre expresada desencadena la muerte celular. ⁽⁴³⁾ Por lo que se evaluó el efecto de las macamidas sobre este importante marcador biológico para saber si la citotoxicidad seguía el mecanismo de apoptosis.

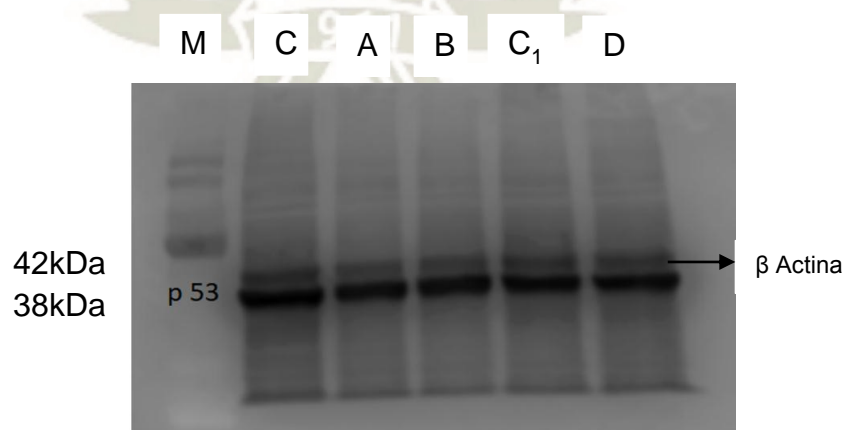


Figura 23. Bandas obtenidas a partir del western blot para p53. Donde M es el marcador molecular, C es control, A es macamida sintética N-becilinolenamida (10 μ M), B es macamida sintética N-becilinolenamida (30 μ M), C₁ es macamida

sintética Metoxi-bencilinolenamida (10 μ M) y D es macamida sintética Metoxi-bencilinolenamida (30 μ M).

La Figura 23 representa las bandas obtenidas para el biomarcador p53, cuyo peso molecular es 38 kDa. Además, se observa la banda para la β actina cuyo peso molecular es de 42 kDa. El marcador utilizado fue de un de peso molecular de 10-180 kDa (ab116027),

La Figura 24 representa la cantidad del biomarcador p53 presente en el control y en las diferentes concentraciones de los tratamientos de las macamidas sintéticas N-bencilinolenamida y Metoxi-bencilinolenamida.

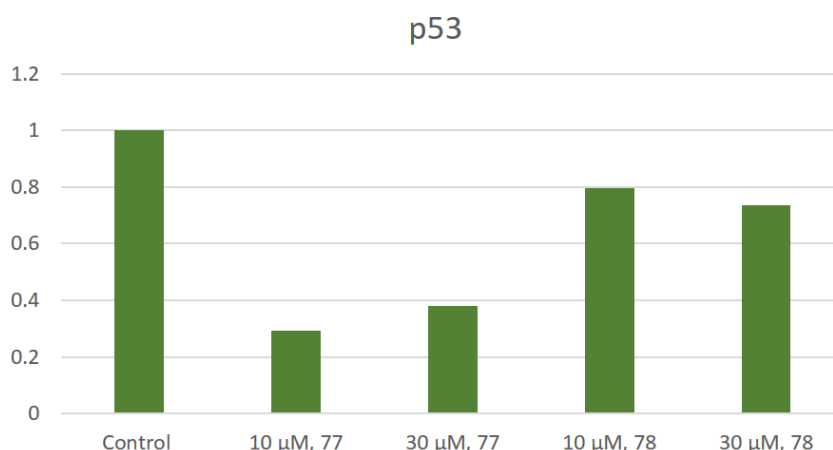


Figura 24. Efecto de las macamidas sintéticas N-bencilinolenamida y Metoxi-bencilinolenamida a concentración 10 μ M y 30 μ M sobre p53 en las líneas celulares SH-SY5Y.

En la Figura 24, se puede observar que, de acuerdo al control, no hubo un incremento de p53 en ningún de los casos. En el control hay presencia de p53 debido a que este biomarcador siempre está presente de manera inactiva. En las células tratadas con la macamida sintética *N-bencilinolenamida* hubo una disminución de p53 debido a que, si hubo una degradación de proteínas, sin embargo, no es producido por la apoptosis. ⁽⁶⁸⁾

Cuando la célula es estresada, p53 se traslada al núcleo e induce la expresión génica pro-apoptótica y bloquea la expresión génica anti-apoptótica. ^(69,70) En células neuronales, la cúrcuma disminuye la cantidad de p53 ⁽⁷¹⁾ al igual que las macamidas sintéticas usadas debido a que evita su fosforilación. ⁽⁷²⁾

3.8. DETERMINACIÓN DE Bcl-2

De la misma manera la Figura 17 fue el punto de partida para el ensayo de *western blot* para el biomarcador Bcl-2.

3.8.1. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA BCL-2 EN LÍNEAS CELULARES SH-SY5Y TRATADAS CON MACAMIDAS SINTÉTICAS *N*-BENCILINOLENAMIDA Y METOXI-BENCILINOLENAMIDA

Bcl2 es una proteína anti-apoptótica, la cual favorece la supervivencia celular, por lo que al ser inhibida desencadena la destrucción controlada de la célula. ⁽³¹⁾ Se realizó la determinación de Bcl-2 debido a que su presencia o ausencia nos ayuda a determinar si existe o no apoptosis.

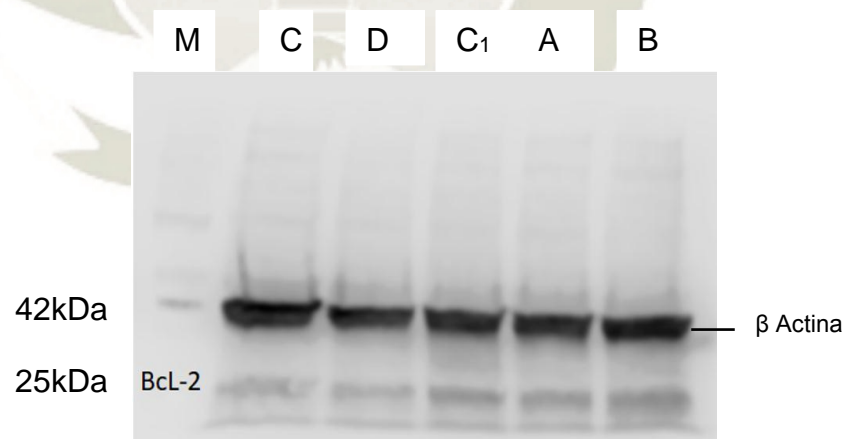


Figura 25. Bandas obtenidas a partir del western blot para Bcl-2. Donde M es el marcador molecular, C es control, A es macamida sintética N-bencilinolenamida (10µM), B es macamida sintética N-bencilinolenamida (30µM), C1 es macamida sintética Metoxi-bencilinolenamida (10µM) y D es macamida sintética Metoxi-bencilinolenamida (30µM).

En la Figura 25, se puede observar la presencia de bandas a 25 kDa lo cual pertenece al peso molecular del biomarcador Bcl-2 y la presencia de bandas a 42 kDa lo cual pertenece a la β -actina. El marcador utilizado fue de un peso molecular de 10-180 kDa (ab116027),

La Figura 26 representa la cantidad del biomarcador Bcl-2 presente en el control y en las diferentes concentraciones de los tratamientos de las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida*.

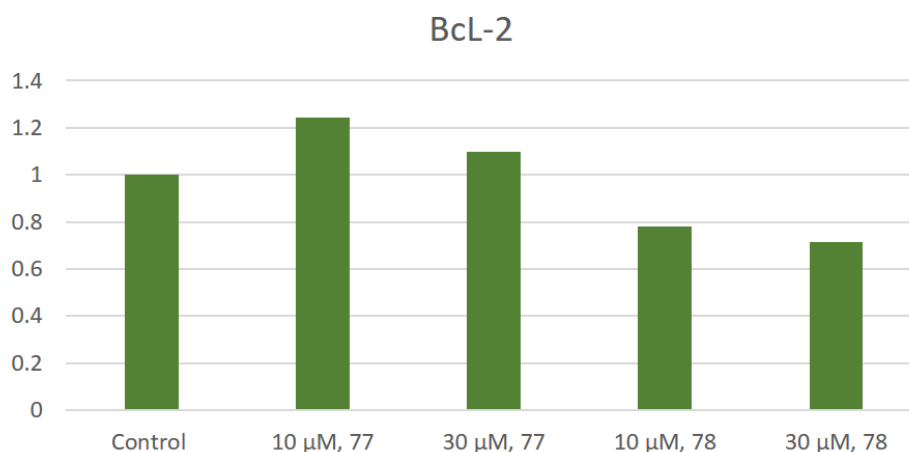


Figura 26. Efecto de las macamidas sintéticas N-bencilinolenamida y Metoxi-bencilinolenamida a concentración 10 μ M y 30 μ M de Bcl-2 en líneas celulares SH-SY5Y.

En la Figura 26, se puede observar que, de acuerdo al control, hubo un incremento de Bcl-2 para la concentración 10 μ M y 30 μ M para la macamida sintética *Metoxi-bencilinolenamida*, el incremento mostrado no es significativo.

3.10. ACTIVIDAD DE CASPASA 3

Para este ensayo, se utilizaron las líneas celulares *SH-SY5Y* con número de pasaje 7, las cuales fueron tratadas con las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida* por 24 horas como se mencionó en el Capítulo 2, se liso las células y se cuantificó las proteínas totales mediante

el método *BCA*. Se añadió el reactivo *DEVD-pNA* para poder evidenciar la presencia de caspasa 3 tras la hidrólisis del reactivo y liberación del cromógeno presente (*pnitroanilina*), lo cual se determinó por espectrofotometría. Los resultados fueron comparados con el control positivo (*Staurosporine*) mediante *GraphPad Prism 6* usando el análisis de varianza de dos vías (*one-way ANOVA*).

Este ensayo fue negativo, por lo que se deduce que la apoptosis no es el mecanismo de muerte celular producido por las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida* en líneas celulares *SH-SY5Y*.

3.10.1. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CASPASA 3 EN LÍNEAS CELULARES *SH-SY5Y* TRATADAS CON MACAMIDAS SINTÉTICAS *N-BENCILINOLENAMIDA* Y *METOXI-BENCILINOLENAMIDA*

Las caspasas son mediadores cruciales de la muerte celular programada (apoptosis). La caspasa 3 es una proteasa de muerte activada, es esencial para los dos tipos de vías apoptóticas (vía intrínseca y extrínseca) ⁽⁷³⁾. Esta caspasa fue evaluada debido a que siempre se encuentra activa en el mecanismo de la apoptosis.

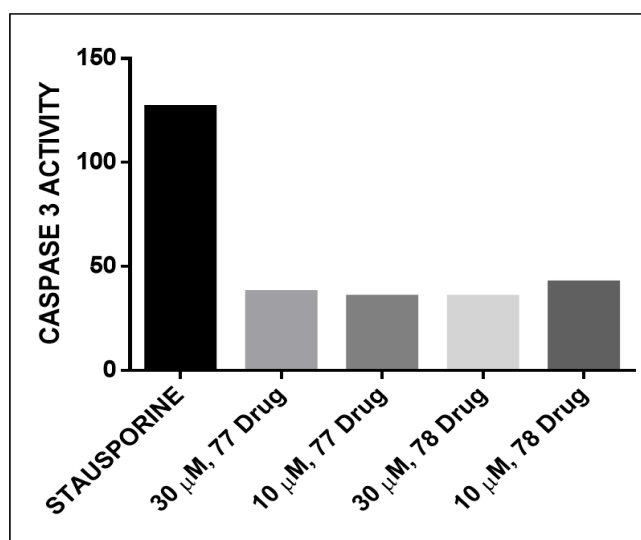


Figura 27. Cantidad de caspasa 3 presente en las diferentes concentraciones de las macamidas.

La Figura 27 representa la cantidad de caspasa 3 producida por el control positivo (*Stausporine*) y los tratamientos de las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida* a 10 μM y 30 μM .

En la Figura 27, la *Stausporine* es utilizada debido a que este compuesto produce la activación de la caspasa 3 presente en el mecanismo de apoptosis. En el caso de las muestras tratadas con macamidas sintéticas no hubo presencia de caspasa 3. Esto significa que la muerte celular no sigue la vía apoptótica.

3.11. DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROS)

Las especies reactivas de oxígeno (EROS) tienen un papel importante en la inducción de la apoptosis. La liberación de citocromo c desde la mitocondria, que desencadena la activación de las caspasas, parece estar mediada en gran medida por la acción directa o indirecta de EROS.

La Figura 28 representa la cantidad de ROS generada por los tratamientos de las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida* a 10 μM , 30 μM y 100 μM , se tiene un control positivo (H_2O_2) a 1000 μM . También se tiene un control, el cual contiene células, pero no se aplicó el reactivo *DCFA* y otro control el cual solo contenía medio *phenol free DMEM*.

Se usó como control positivo al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) debido a que desencadena producción de ROS. Como se observa en la Figura 27, las células con el tratamiento fueron incubadas durante 2, 4 y 5 horas, como se mencionó en el Capítulo 2. Pasado el tiempo las absorbancias fueron leídas a 492nm en el Espectrofotómetro. En las muestras estudiadas se observó un aumento de EROS, pero no fue significativo, por lo que se procedió a analizar las muestras en el microscopio de fluorescencia para confirmar si a 100 μM había producción de EROS.

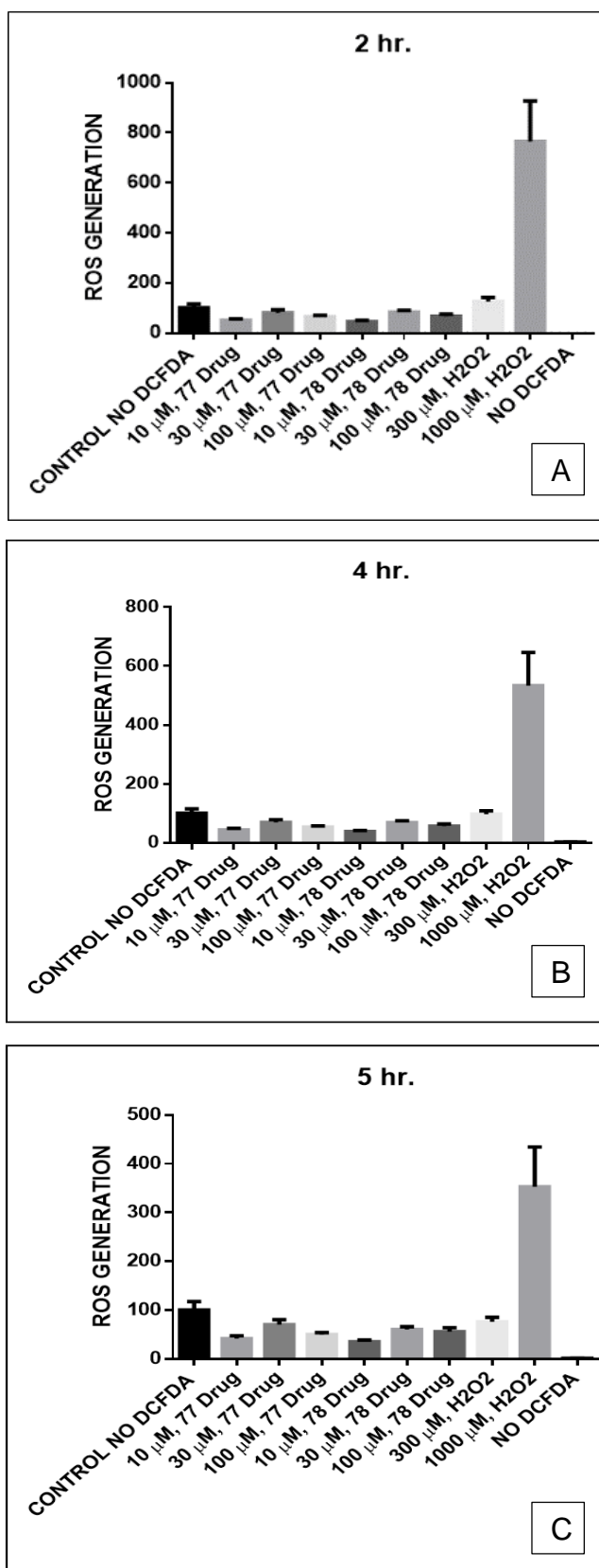


Figura 28. Generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) a las 2 horas (A), 4 horas (B) y 5 horas (C) producidas por las macamidas sintéticas N-bencilinolenamida y Metoxi-bencilinolenamida (10 μM, 30 μM y 100 μM).

3.12 DETECCIÓN DE EROS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Como en el ensayo anterior, hubo un incremento de EROS el cual no fue significativo se recurrió a la Microscopía de Fluorescencia para evidenciar visualmente ese pequeño incremento, porque como ya se sabe este ensayo percibe la fluorescencia a bajas o altas intensidades.

3.12.1. DETECCIÓN A BAJA INTENSIDAD

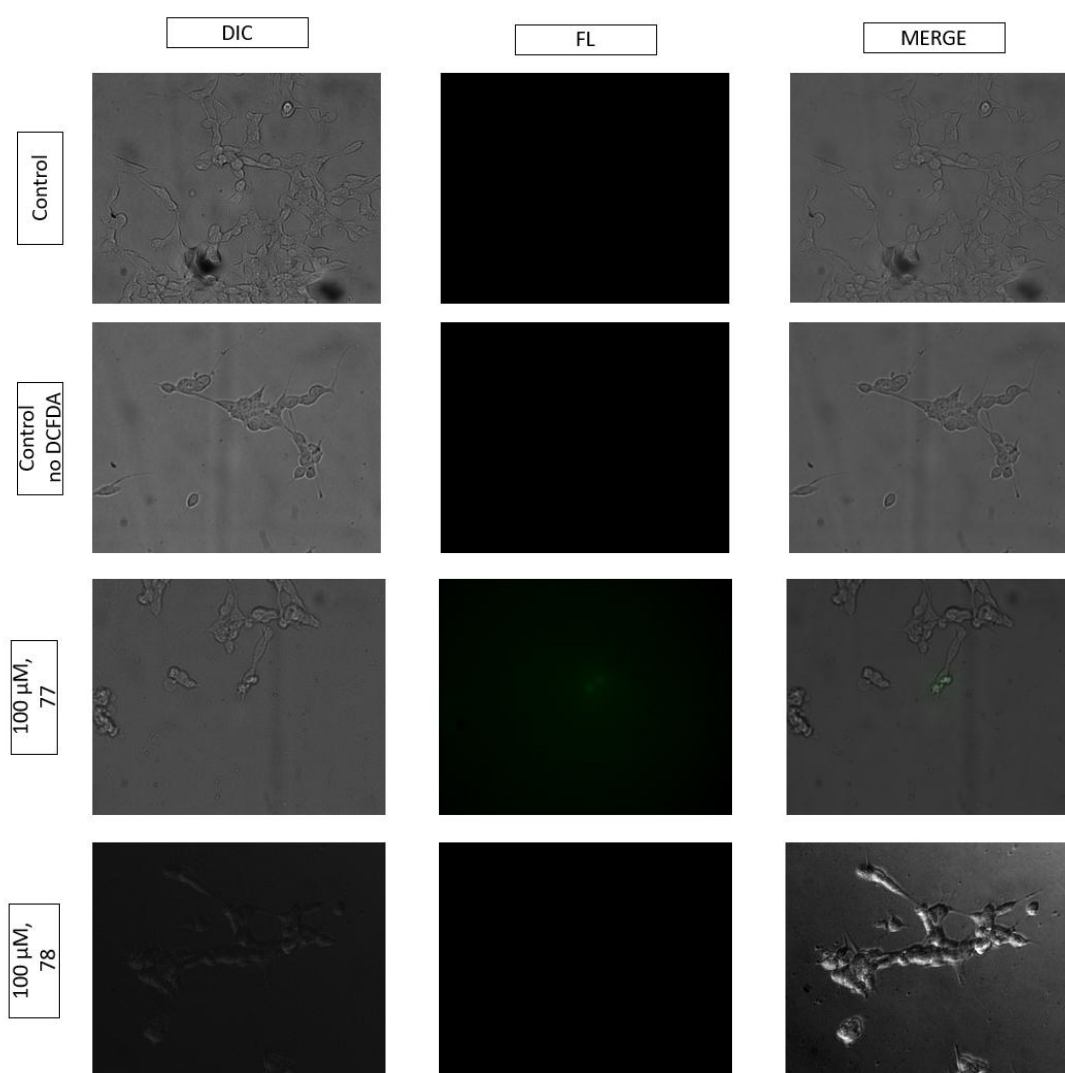


Figura 29. Líneas celulares SH-SY5Y tratadas con las macamidas sintéticas N-bencilinolenamida (77) y Metoxi-bencilinolenamida (100 μ M)(78) en el microscopio de fluorescencia a baja intensidad.

En la Figura 29, las fotos fueron tomadas a baja intensidad donde se puede observar que en la columna de DIC se tomaron las fotos normales. En la columna de FL las fotos fueron tomadas con fluorescencia. La última columna *MERGE*, es el resultado de solapar *DIC* y *FL*. Con *MERGE* se pudo observar que existía fluorescencia en la macamida sintética *N-bencilinolenamida* a 100 μM de concentración. Utilizando *MERGE* ayudó a que la fluorescencia se pueda observar de manera más clara.

3.12.2 DETECCIÓN A ALTA INTENSIDAD

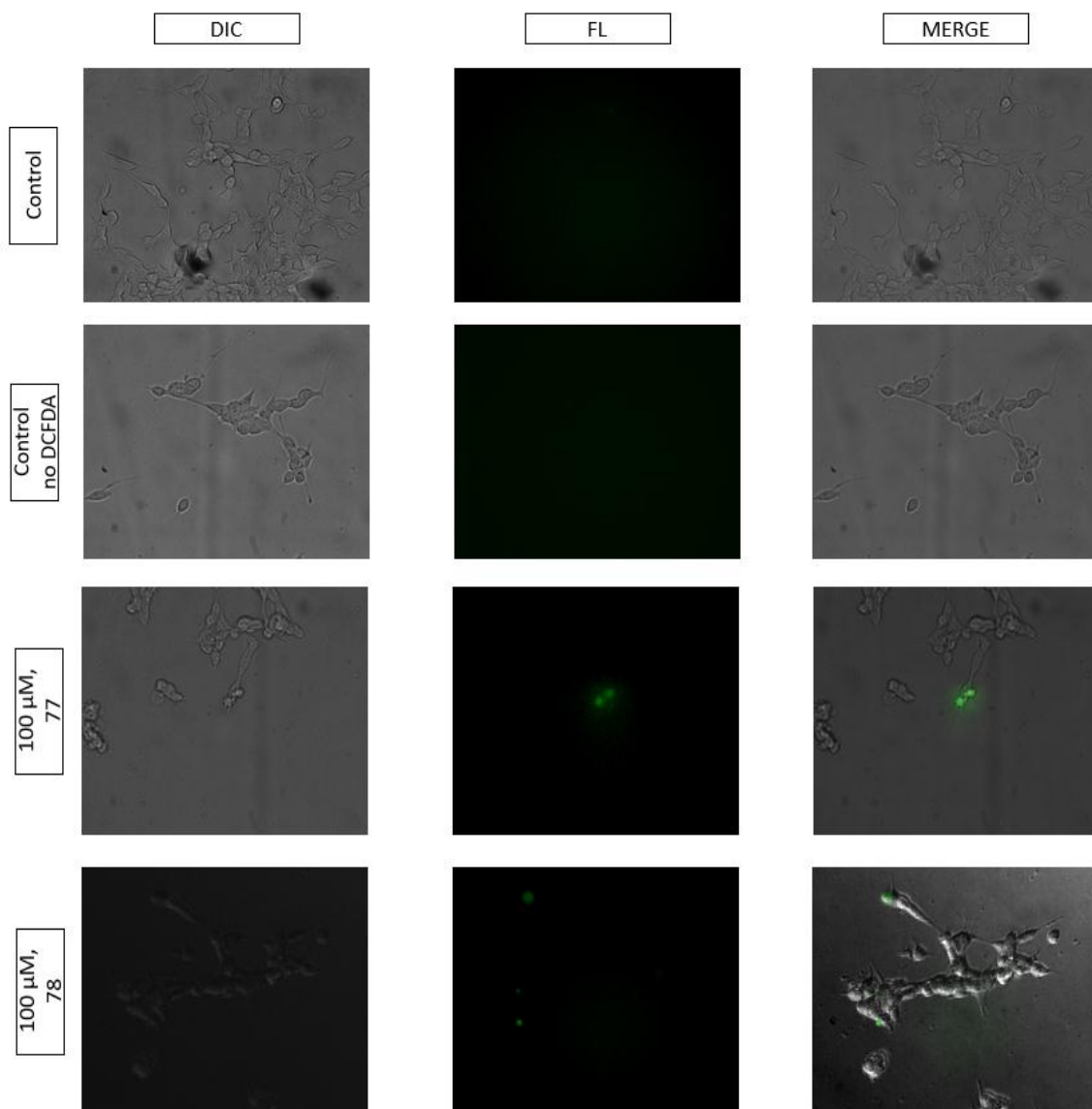


Figura 30. Líneas celulares SH-SY5Y tratadas con las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida* (100 μM) en el microscopio de fluorescencia a alta intensidad.

En la Figura 30, las fotos fueron tomadas a alta intensidad y se puede observar que en la columna de DIC se tomaron las fotos normales. En la columna de FL las fotos fueron tomadas con fluorescencia. En la última columna *MERGE*, se mezclaron en la foto tanto *DIC* como *FL*. Con *MERGE* se pudo observar que si existía fluorescencia en la macamida sintética *N-becilinolenamida* a 100 μM . También se pudo observar que en la macamida sintética *Metoxibencilinolenamida* a 100 μM de concentración hubo fluorescencia.

Al observar la columna de *MERGE* de las Figuras 29 y 30 se puede observar la presencia de fluorescencia la cual se produce al tratar la línea celular con estas macamidas sintéticas. La presencia de ROS en las células indica un tipo muerte celular.

3.12.3. DETECCIÓN DE EROS PRODUCIDA POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

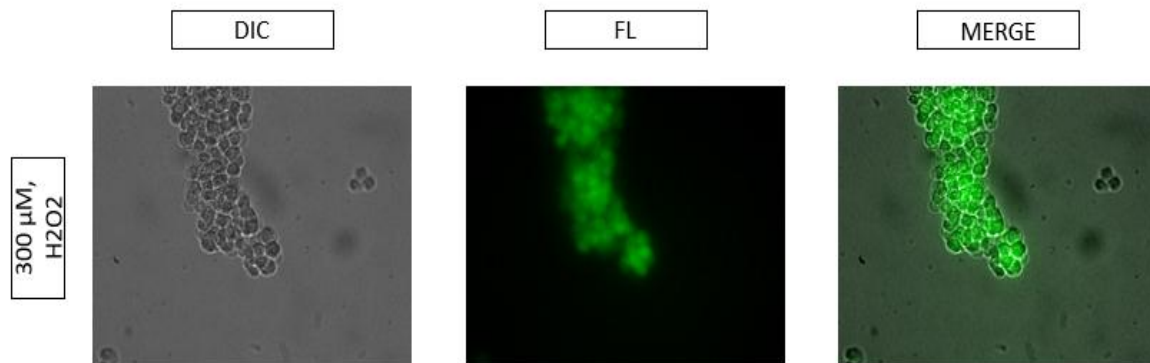


Figura 31. Líneas celulares SH-SY5Y tratadas con peróxido de hidrógeno 1000 μM (H_2O_2) en el microscopio de fluorescencia.

En la Figura 31, se muestra el control positivo con peróxido de hidrógeno 1000 μM . Como se dice en la literatura, este produce ROS a diferentes concentraciones, lo cual se puede evidenciar en las columnas *FL* y *MERGE*.



4. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

4.1. CONCLUSIONES

1. Se concluyó que las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida* si producen citotoxicidad en las líneas celulares *SH-SY5Y* a concentraciones 10 μM , 30 μM y 100 μM , produciendo una disminución en la viabilidad celular.
2. La IC_{50} de la macamida sintética *N-bencilinolenamida* es de 12,8 μM y de la macamida sintética *Metoxi-bencilinolenamida* es de 53,3 μM , por lo que se podría concluir que la macamida sintética *N-bencilinolenamida* es más citotóxica que la *Metoxi-bencilinolenamida*.
3. Se concluyó que la apoptosis no es responsable del mecanismo de muerte celular producido por las macamidas sintéticas *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida*, por lo que se necesitaran estudios posteriores para determinar cuál fue mecanismo de muerte celular.
4. Al dar fluorescencia en la prueba de ROS se dice que se dio la formación de especies reactivas y en consecuencia oxidación, por lo que se puede presumir que la vía de muerte celular que se sigue sería necrosis. Se necesitan realizar más ensayos para confirmarlo.
5. El aumento de Bcl-2 encontrado para la macamida sintética *N-bencilinolenamida* no fue significativo, sin embargo, es un indicio del mecanismo de defensa de la línea celular de neuroblastoma. En el caso de la macamida sintética *Metoxi-bencilinolenamida*, hubo una disminución. Lo que confirma que la macamida sintética *N-bencilinolenamida* es más citotóxica que la macamida

sintética *Metoxi-bencilinolenamida*, aunque se necesitaran más ensayos para confirmarlo.



4.2. SUGERENCIAS

1. Analizar los demás componentes de la maca debido a que los que produjeron la citotoxicidad fueron las macamidias *N-bencilinolenamida* y *Metoxi-bencilinolenamida*.
2. Comparar el efecto citotóxico que produce el extracto vegetal de la maca vs el que producen los componentes por separado.
3. Formular los productos farmacéuticos en base a que en la investigación dio como resultado que el efecto negativo se produce a altas concentraciones.
4. Estudiar los otros mecanismos que producen la muerte celular para determinar cuál es el mecanismo exacto que produce esta citotoxicidad.

Bibliografía

1. Bianchi A. MACA *Lepidium meyenii*. Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromáticas. 2003 [cited 2018 Oct 5];2:30–6.
2. Ochoa C. Maca (*Lepidium meyenii* walp.; Brassicaceae): A nutritious root crop of the central andes. Econ Bot. 2001 Jul [cited 2018 Oct 5];55(3):344–5.
3. Janampa Santome MC. Desempeño fisiológico de las plantas de *Lepidium meyenii* Walp. (maca) en condiciones de bajas temperaturas. Univ Peru Cayetano Hered. 2016 [cited 2018 Oct 5].
4. Ganzera M, Zhao J, Muhammad I, Khan IA. Chemical profiling and standardization of *Lepidium meyenii* (Maca) by reversed phase high performance liquid chromatography. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2002 Jul [cited 2018 Oct 5];50(7):988–91.
5. Dini A, Migliuolo G, Rastrelli L, Saturnino P, Schettino O. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. Food Chem. 1994 Jan 1 [cited 2018 Oct 5];49(4):347–9.
6. Balick MJ, Lee R. Maca: from traditional food crop to energy and libido stimulant. Altern Ther Health Med. [cited 2018 Oct 5];8(2):96–8.
7. Gonzales GF, Gonzales C, Gonzales-Castañeda C. *Lepidium meyenii* (Maca): A Plant from the Highlands of Peru – from Tradition to Science. Forschende Komplementärmedizin / Res Complement Med. 2009 Dec [cited 2018 Oct 5];16(6):373–80.
8. Sifuentes-Penagos G, León-Vásquez S, Paucar-Menacho LM. Study of Maca (*Lepidium meyenii* Walp.), Andean crop with therapeutic properties. Sci Agropecu. 2015 Jun 30 [cited 2018 Oct 5];6(2):131–40.
9. Wu H, Kelley CJ, Pino-Figueroa A, Vu HD, Maher TJ. Macamides and their synthetic analogs: Evaluation of in vitro FAAH inhibition. Bioorg Med Chem. 2013 Sep 1 [cited 2018 Oct 5];21(17):5188–97.
10. Zheng BL, He K, Kim CH, Rogers L, Shao Y, Huang ZY, et al. Effect of a

- lipidic extract from lepidium meyenii on sexual behavior in mice and rats. *Urology*. 2000 Apr [cited 2018 Oct 5];55(4):598–602.
11. Pino-Figueroa A, Nguyen D, Maher TJ. Neuroprotective effects of *Lepidium meyenii* (Maca). *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Jun [cited 2018 Oct 5];1199(1):77–85.
 12. Rubio J, Caldas M, Dávila S, Gasco M, Gonzales GF. Effect of three different cultivars of *Lepidium meyenii* (Maca) on learning and depression in ovariectomized mice. *BMC Complement Altern Med*. 2006 Jun 23 [cited 2018 Oct 5];6:23.
 13. Instituto Nacional de la Nutrición (Mexico) M, Tovar AR, del Prado M, Torres N. *Revista de investigación clínica*. Vol. 57, *Revista de investigación clínica*. Instituto Nacional de la nutrición; 2005 [cited 2018 Oct 28]. 457-472 p.
 14. Gonzales GF, Villaorduña L, Gasco M, Rubio J, Gonzales C. Maca (*Lepidium meyenii* WALP), una revisión sobre sus propiedades biológicas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2014 Mar 14 [cited 2018 Oct 28];31(1).
 15. Philippeos C, Hughes RD, Dhawan A, Mitry RR. Introduction to Cell Culture. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2012 [cited 2018 Oct 5]. p. 1–13.
 16. Introduction to Cell Culture - PE. [cited 2018 Oct 16]; Available from: <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>
 17. Wilkaniec A, Gąssowska M, Czapski GA, Cieślik M, Sulkowski G, Adamczyk A. P2X7 receptor-pannexin 1 interaction mediates extracellular alpha-synuclein-induced ATP release in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Purinergic Signal*. 2017 Sep [cited 2018 Oct 5];13(3):347–61.
 18. Pählman S, Hoehner JC, Nånberg E, Hedborg F, Fagerström S, Gestblom C, et al. Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 1995 Jan 1 [cited 2018 Oct 5];31(4):453–8.

19. Gimenez-Cassina A, Lim F, Diaz-Nido J. Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. *J Neurosci Res*. 2006 Sep [cited 2018 Oct 5];84(4):755–67.
20. Laboratorio de Genómica Viral y Humana, Facultad de Medicina UASLP. Standard Operating Procedures (SOPs) Laboratorio de Genómica Viral y Humana Facultad de Medicina UASLP Conteo celular y evaluación de viabilidad. 2008 [cited 2018 Nov 1]. Available from: http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_counts_SPA.pdf
21. Ángel M, Piedra M. Universidad de Granada. [cited 2018 Nov 5]. Available from: <https://hera.ugr.es/tesisugr/24364447.pdf>
22. abcam. MTS Assay Kit (Cell Proliferation) (Colorimetric). [cited 2018 Nov 5]. Available from: <https://www.abcam.com/mts-assay-kit-cell-proliferation-colorimetric-ab197010.html>
23. Baoliang Cui, Bo Lin Zheng, Kan He and, Zheng* QY. Imidazole Alkaloids from *Lepidium meyenii*. 2003 [cited 2018 Oct 5].
24. Piacente S, Carbone V, Plaza A, Zampelli A, Pizza C. Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* Walp.). *J Agric Food Chem*. 2002 Sep 25 [cited 2018 Oct 5];50(20):5621–5.
25. Adolfo Elena G. Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis.. [cited 2018 Oct 28].
26. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun 25 [cited 2018 Oct 5];35(4):495–516.
27. Roth KA. Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: causation, correlation, and confusion. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001 Sep [cited 2018 Oct 5];60(9):829–38.
28. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980 [cited 2018 Oct 5];68:251–306.
29. Ferraro E, Cecconi F. The Apoptosome: The Executioner of Mitochondria-mediated Apoptosis. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK:

- John Wiley & Sons, Ltd; 2009 [cited 2018 Oct 16].
30. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9*. 1999 [cited 2018 Oct 16].
 31. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang F-T, Zhou T-T, Liu B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 2012 Dec [cited 2018 Oct 5];45(6):487–98.
 32. Fatokun AA, Dawson VL, Dawson TM. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol.* 2014 Apr [cited 2018 Oct 16];171(8):2000–16.
 33. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 2007 Nov 15 [cited 2018 Oct 16];21(22):2861–73.
 34. Boya P. Autofagia: cómo nuestras células se reciclan (Especial Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2016). 2017 Jan [cited 2018 Oct 28].
 35. D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ.* 2010 Jul 4 [cited 2018 Oct 5];17(7):1104–14.
 36. Biosciences BD. Application Note Caspase-3 Activation: An Indicator of Apoptosis in Image-Based Assays. 2012 [cited 2018 Oct 5]. Available from:
https://www.bdbiosciences.com/documents/Bioimaging_AppNote_Apoptosis.pdf
 37. Elinos-Báez CM, Maldonado V, Meléndez-Zajgla J. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. Vol. 139. 2003 [cited 2018 Oct 5].
 38. Oltersdorf T, Fritz LC. The Bcl-2 Family: Targets For The Regulation Of Apoptosis. *Annu Rep Med Chem.* 1998 Jan 1 [cited 2018 Oct 16];33:253–62.
 39. Hardwick JM, Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Feb 1 [cited 2018 Oct 16];5(2).

40. Programmed Cell Death. *Cell Biol.* 2017 Jan 1 [cited 2018 Oct 16];797–815. Available from:
41. Donahue JE, Flaherty SL, Johanson CE, Duncan JA, Silverberg GD, Miller MC, et al. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2006 Sep 28 [cited 2018 Oct 5];112(4):405–15.
42. Goto JJ, Tanzi RE. The role of the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP1) in alzheimer's A β generation. *J Mol Neurosci.* 2002 Aug [cited 2018 Oct 5];19(1–2):37–41.
43. Cardaci S, Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Reactive Oxygen Species Mediate p53 Activation and Apoptosis Induced by Sodium Nitroprusside in SH-SY5Y Cells. *Mol Pharmacol.* 2008 Aug 1 [cited 2018 Oct 5];74(5):1234–45.
44. Prasad JM, Migliorini M, Galisteo R, Strickland DK. Generation of a Potent Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1) Antagonist by Engineering a Stable Form of the Receptor-associated Protein (RAP) D3 Domain. *J Biol Chem.* 2015 Jul 10 [cited 2018 Oct 5];290(28):17262–8.
45. Martire S, Mosca L, d'Erme M. PARP-1 involvement in neurodegeneration: A focus on Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mech Ageing Dev.* 2015 Mar [cited 2018 Oct 5];146–148:53–64.
46. Weaver AN, Yang ES. Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer. *Front Oncol.* 2013 Nov 27 [cited 2018 Oct 5];3:290.
47. Martire S, Fuso A, Rotili D, Tempera I, Giordano C. PARP-1 Modulates Amyloid Beta Peptide-Induced Neuronal Damage. *PLoS One.* 2013 [cited 2018 Oct 10];8(9):72169.
48. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 1997 Feb 21 [cited 2018 Oct 5];275(5303):1129–32.
49. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative

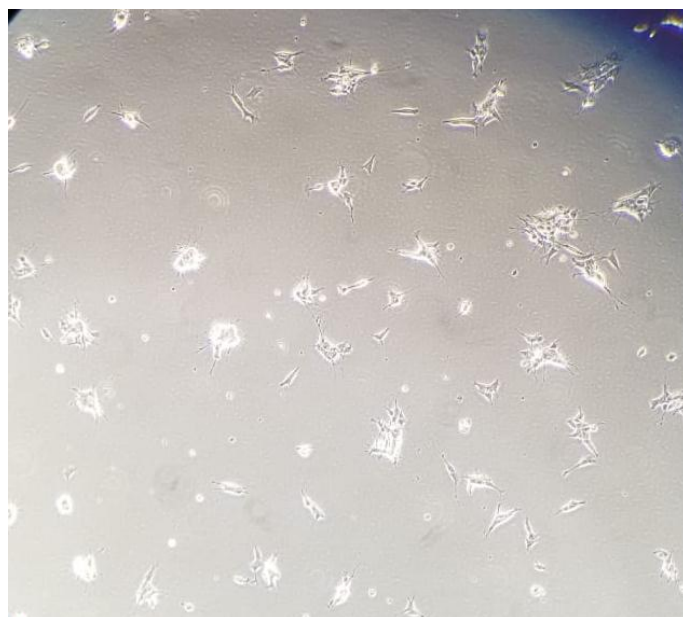
- stress. *Curr Biol* [Internet]. 2014 May 19 [cited 2018 Oct 21];24(10):R453-62.
50. Apel K, Hirt H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol*. 2004 Jun 2 [cited 2018 Oct 16];55(1):373–99.
 51. Procedure for Lysis of Monolayer-cultured Mammalian Cells. 2011 [cited 2018 Oct 16]. Available from: www.thermoscientific.com/pierce
 52. Associate A. User Guide: Pierce BCA Protein Assay Kit (MAN0011430 Rev. A). [cited 2018 Oct 11]. Available from: www.thermoscientific.com/pierce
 53. Mahmood T, Yang P-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012 Sep [cited 2018 Oct 16];4(9):429–34.
 54. Veiga Ariana. Western Blot Introducción y Optimización [Internet]. 2013. Available from: <https://docs.abcam.com/pdf/events/spanish-wb-webinar.pdf>
 55. abcam. Protocols Book [Internet]. 2017 [cited 2018 Oct 28]. Available from: <https://docs.abcam.com/pdf/misc/abcam-protocols-book-2010.pdf>
 56. Caspase-3/ CPP32 Colorimetric Assay Kit [Internet]. [cited 2018 Oct 16]. Available from: www.biovision.com
 57. ThermoFisher. CM-H2DCFDA (General Oxidative Stress Indicator) - Thermo Fisher Scientific [Internet]. [cited 2018 Oct 16]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C6827>
 58. Ramírez Vélez CI, Santa J, Tapia O. Tlamati Sabiduría, Volumen 7 Número Especial 2 (2016) 4º Encuentro de Jóvenes Investigadores- CONACYT Área III: Medicina y Ciencias de la Salud. [cited 2018 Oct 10].
 59. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 [cited 2018 Oct 16].

60. African Networks on Ethnomedicines. E, Foucheb G, Steenkamp V. African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM. Vol. 10, African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. [African Networks on Ethnomedicines]; 2004 [cited 2018 Oct 10]. 6-11 p.
61. Gugnani KS, Vu N, Rondón-Ortiz AN, Böhlke M, Maher TJ, Pino-Figueroa AJ. Neuroprotective activity of macamides on manganese-induced mitochondrial disruption in U-87 MG glioblastoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018 Feb 1 [cited 2018 Oct 28];340:67–76.
62. Ko HL, Ren EC. Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription. *Biomolecules.* 2012 Nov 12 [cited 2018 Oct 5];2(4):524–48.
63. Thermo Fisher. Restore Western Blot Stripping Buffer [Internet]. 2014 [cited 2018 Oct 16]. Available from: www.thermoscientific.com/pierce
64. Schiewer MJ, Knudsen KE. Transcriptional Roles of PARP1 in Cancer. *Mol Cancer Res.* 2014 [cited 2018 Oct 24];12(8).
65. Rondon-Ortiz Alejandro. *Lepidium meyenii* inhibits MAGL and increases the expression of LRP1 in neuroblastoma SH-SY5Y cells | The FASEB Journal. The FASEB. 2016 [cited 2018 Oct 10].
66. Estrada Rodríguez AE, Chantal V, Signoret Z, De P, Agregación LA, Péptido D, et al. PAPEL DE LA AGREGACIÓN DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. 2017 [cited 2018 Nov 1].
67. Azmi NH, Ismail M, Ismail N, Imam MU, Alitheen NBM, Abdullah MA. Germinated Brown Rice Alters A β (1-42) Aggregation and Modulates Alzheimer's Disease-Related Genes in Differentiated Human SH-SY5Y Cells. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2015 Dec 22 [cited 2018 Oct 24];2015:1–12.
68. Joaquín J, Gómez-Lázaro M, Fernández-Gómez FJ, Jordán J. La proteína p53 en procesos neurodegenerativos en sus 25 años de historia. *REV NEUROL.* 2004 [cited 2018 Oct 16];39(3):243–50.

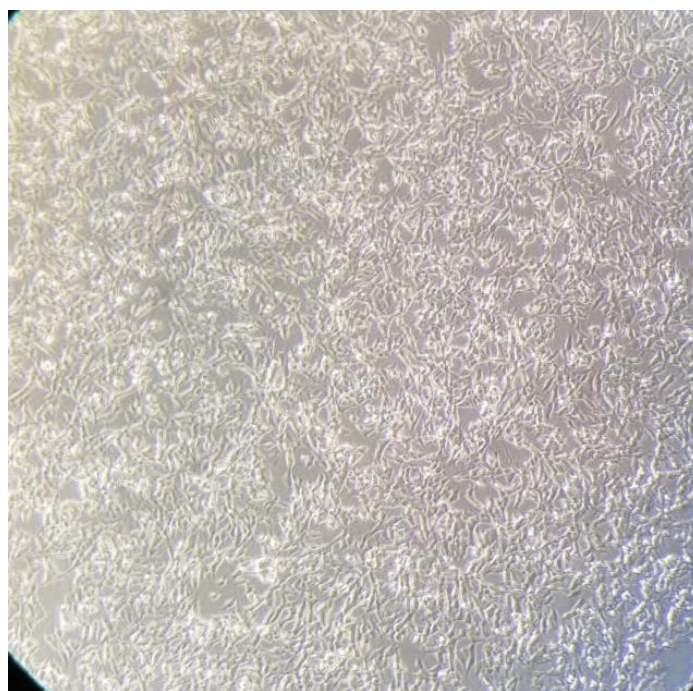
69. Miyashita T, Reed JC. Tumor Suppressor p53 Is a Direct Transcriptional Activator of the Human bax Gene. Vol. 80, Cell. 1995 [cited 2018 Oct 11].
70. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. J Cell Sci. 2003 Oct 15 [cited 2018 Oct 11];116(Pt 20):4077–85.
71. Jaisin Y, Thampithak A, Meesarapee B, Ratanachamnong P, Suksamrarn A, Phivthong-ngam L, et al. Curcumin I protects the dopaminergic cell line SH-SY5Y from 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity through attenuation of p53-mediated apoptosis. Neurosci Lett. 2011 Feb [cited 2018 Oct 11];489(3):192–6.
72. Kitamura Y, Kosaka T, Kakimura JI, Matsuoka Y, Kohno Y, Nomura Y, et al. Protective effects of the antiparkinsonian drugs talipexole and pramipexole against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Mol Pharmacol. 1998 Dec 1 [cited 2018 Oct 24];54(6):1046–54.
73. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. Cell Death Differ. 1999 Feb 28 [cited 2018 Oct 5];6(2):99–104.

ANEXOS

Anexo 1



Observación de células pertenecientes a la línea celular *SH-SY5Y* inmaduras
(10X)



Observación de células pertenecientes a la línea celular *SH-SY5Y* maduras
(10X)

Anexo 2

Tablas de resultados referidos a data cruda

0	0.3 μ M	0.1 μ M	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M
100.5043	90.67003	102.0173	98.99136	77.8098	78.56628	46.03746	-1.621037
105.0432	90.67003	109.5821	102.7738	85.37464	92.93948	50.57637	-5.403458
98.99136	97.47839	107.3127	118.6599	87.64409	108.0692	45.28098	-6.159943
103.5303	111.0951	112.6081	122.4424	98.23487	90.67003	46.03746	-7.672911
89.91354	88.40057	111.0951	94.45245	73.2709	74.78386	19.56052	-11.45533
102.0173	96.7219	101.2608	101.2608	83.10519	58.89769	27.88184	-10.69885
126.8437	137.1681	126.8437	108.2596	72.12389	61.79941	-9.439528	-3.244838
104.1298	90.70796	125.8112	100	53.53982	49.41003	-3.244838	1.917404
104.1298	98.96755	115.4867	96.90266	49.41003	47.34513	-8.40708	-8.40708
90.70796	100	115.4867	100	54.57227	40.11799	-9.439528	-8.40708
86.57817	110.3245	138.2006	97.9351	55.60472	40.11799	-7.374631	-1.179941
87.61062	116.5192	118.5841	96.90266	69.02655	42.18289	-4.277286	-14.60177

Anexo 3

Tablas de resultados referidos a data cruda

0	0.1	0.3 μ M	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M
127.7131	96.4136	106.8468	121.8444	106.1947	82.068	82.72008	47.50815
85.98044	93.15324	82.068	84.02422	94.45738	60.5496	88.58873	44.89986
95.76153	110.1071	100.326	117.932	110.7592	89.2408	78.15556	50.11644
98.36982	126.4089	124.4527	99.67397	104.8905	88.58873	102.2823	60.5496
88.58873	114.6716	110.7592	91.84909	102.2823	82.72008	92.50117	62.50582
103.5864	108.1509	112.7154	91.19702	99.67397	85.32836	86.63251	72.28691
126.4605	197.0218	184.1924	147.3081	108.8202	51.0882	12.60023	-13.05842
108.8202	195.4181	187.3998	139.2898	110.4238	49.48454	17.41123	-21.07675
91.17984	200.2291	179.3814	124.8568	128.0641	44.67354	22.22222	-22.68041
116.8385	203.4364	200.2291	132.8751	132.8751	33.44788	30.24055	-25.88774
70.33219	182.5888	174.5704	113.6312	121.6495	22.22222	31.84422	-29.09507
86.36884	203.4364	205.0401	131.2715	160.1375	44.67354	36.65521	-19.47308